
Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Allgemeine Pädiatrie I

**Regulation der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 in systemischen
Entzündungszuständen unter besonderer Berücksichtigung des
Mediators Stickstoffmonoxid**

zur Erlangung des Doktorgrades der theoretischen Medizin des Fachbereiches
Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Annette Gans
aus Frankfurt am Main
Frankfurt am Main 2002

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Referent: Prof. Dr. H.J. Böhles

Korreferent: Priv. Doz. M. Kaszkin

Tag der mündlichen Prüfung: 29. September 2003

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG **1**

1.1. Das Carnitinsystem	2
1.1.1. Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1)	3
1.1.2. Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT 2)	4
1.2. Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.3. Stickstoffmonoxid und Entzündungsreaktionen	5
1.4. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)	6
1.5. Ziel der Arbeit	8

2. MATERIAL **9**

2.1. Geräte	9
2.2. Chemikalien und Labormaterial	10
2.3. Enzyme	12
2.3.1. Restriktionsenzyme	12
2.3.2. DNA/RNA-Polymerasen	12
2.3.3. Sonstige Enzyme	12
2.4. Plasmide	13
2.5. Lösungen	14
2.5.1. Nährmedium zur Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	15
2.5.2. Medium für <i>E.coli</i> -Kulturen	15
2.5.3. Lösungen zur Plasmidpräparation	15
2.5.4. Lösungen für Agarosegelelektrophorese	16

2.5.5. Lösungen für RNA-Isolation	16
2.5.6. Lösungen für SDS-PAGE	17
2.5.7. Lösung für immunologischen Nachweis von Proteinen	18
2.5.8. Lösungen zur Proteinextraktion	18
2.5.9. Lösung zur Präparation von nuklearen Zellextrakten	19
2.5.10. Lösungen zur Präparation von intakten Kernen	20
2.5.11. Lösungen für Mobility-Shift DNA-Binding Assay	21
2.5.12. Lösungen für Northern-Blot	21
2.7. Antibiotika	22
2.8. Medien für Zellkultur	22

3. METHODEN

23

Molekularbiologische Methoden

3.1. Erzeugung kompetenter Zellen (<i>E. coli</i> XL1-blue)	23
3.2. Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen	24
3.3. Ansetzen einer Über-Nacht-Kultur (ON-Kultur)	25
3.4. Plasmidpräparation	25
3.4.1. Plasmide	25
3.4.2. Plasmidpräparation	26
3.4.2.1. Plasmidpräparation aus 2ml Über-Nacht-Kultur (Mini-Präp)	26
3.4.2.2. Plasmidpräparation aus 50-200 ml Über-Nacht-Kultur (Midi-Präp)	27
3.5. Restriktionsverdau	28
3.5.1. Analytischer Restriktionsverdau	28
3.5.2. Präparativer Restriktionsverdau	29
3.6. Agarose-Gelelektrophorese	29
3.6.1. Agarose-Gel	30
3.6.2. Probenvorbereitung	30
3.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung	30

3.8. Bestimmung der RNA-Reinheit	30
3.8.1. Formaldehydhaltiges RNA-Agarose-Gel	31
3.9. Isolierung von DNA aus einem Agarose-Gel	31
3.10. Ligation	32
3.11. Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur	33
3.12. RNA-Isolation (n. Sacchi 1987)	33
3.13. Northern-Blot Analyse	34
3.14. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT <u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)	35
3.14.1. Reverse Transkriptase (RT)	35
3.14.2. Polymerasekettenreaktion	36
3.14.3. Semiquantitative PCR	37
3.14.4. Nested PCR	38
3.15. Sequenzierung nach Sanger et al.	38
3.15.1. PCR Reaktion	39
3.15.2. Sequenzierung im automatischen DNA Sequenzer ABI 310	39
3.16. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	39
3.16.1. Präparation von nuklearen Extrakten (modifiziert nach Dignam et al.)	40
3.17. DNase I hypersensitive Stellen	40
3.17.1. Präparation von intakten Kernen aus Mesangiumzellen	40
3.17.2. DNase I Verdau	41
3.18. Transfektion	41

Biochemische Methoden

3.19. Protein-Isolierung aus Mesangiumzellen	42
3.19.1. Protein-Bestimmung nach BIO-RAD	43
3.19.2. Fällung von Proteinen	43
3.20. Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)	43
3.20.1. Auftragen der Proben auf das Gel	44
3.20.2. Elektrophorese-Laufbedingungen	44
3.20.3. Coomassie-Färbung	44
3.21. Immunoblotting unter Verwendung der Western-Blot-Technik	45
3.21.1. Ponceau-Färbung	45
3.21.2. Immunologischer Nachweis des Proteins	46
3.21.3. Nachweis mittels ECL	46

Zellkultur **47**

3.22. Passagieren der Zellen	47
3.23. Hungern der Zellen	47
3.24. Nitrit Analyse	47

4. ERGEBNISSE	48
4.1. Nachweis der CPT 1 mRNA aus dem Genom von Ratten-Mesangiumzellen	48
4.2. Immunologischer Nachweis des CPT 1 Proteins in Ratten-Mesangiumzellen	49
4.3. Charakterisierung der CPT 1 mRNA Expression nach Stimulation mit IL-1 β	50
4.3.1. Interleukin 1 β Konzentration	50
4.3.2. Inkubationszeit	51
4.4. Einfluss von Palmitat und Carnitin auf die Zytokin-induzierte CPT 1 mRNA Expression	52
4.5. Wirkung von Carnitin und Palmitat auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 Protein Expression	54
4.6. Einfluss von verschiedenen Substraten auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 mRNA Expression	55
4.7. Einfluss von NO auf die IL-1 β -induzierte mRNA Expression	56
4.7.1. Deta-NO Konzentrationsabhängigkeit	57
4.7.2. Deta-NO Zeitkinetik	58
4.8. Einfluss von NO auf die Zytokin-induzierte CPT 1 Protein Expression	59
4.9. Regulation der CPT 1 mRNA Expression im hämorrhagischen Schock	60
4.10. Klonierung des CPT 1 Promotors	61
4.11. Einfluss des PPAR- α Agonisten Wy 14643 auf die CPT 1 mRNA Expression	62
4.12. Regulation der induzierbaren NO-Synthase	63
4.12.1. Analyse der DNase I hypersensitive sites der 5' Region des iNOS Gens	63
4.12.2. Effekte von PPAR- α Agonisten und dem Inhibitor MK 866 auf die Zytokin-induzierte Nitrit Bildung	65
4.12.3. Wirkung von Wy 14643 auf die IL-1 β - und cAMP-induzierte iNOS Protein Expression	68

4.12.4. Wirkung von Wy 14643 auf die Zytokin-induzierte iNOS mRNA Expression	69
4.12.5. Regulation der iNOS-Promotor Aktivität durch Wy 14643	70
4.12.6. Punktmutation des PPAR Elements	73
4.12.7. Untersuchung der Wy 14643-induzierten Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1	74
5. DISKUSSION	76
<hr/>	
5.1. Eignung von Ratten-Mesangiumzellen als Expressionssystem	76
5.2. Effekte unterschiedlicher Fettsäuren auf die Zytokin-induzierte CPT 1 Expression	76
5.3. Klonierung des L-CPT 1 Promotors	78
5.4. Regulation der CPT 1 mRNA Expression im Endotoxinschock am Beispiel eines LPS Ratten Modells	78
5.5. Wirkung von NO auf die Regulation der CPT 1	79
5.6. NO und Hypoxie	80
5.7. Regulation der induzierbaren NO-Synthase durch PPAR- α	81
6. ZUSAMMENFASSUNG	86
<hr/>	
7. SUMMARY	88
<hr/>	
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
<hr/>	

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	92
---------------------------------	-----------

10. LITERATURVERZEICHNIS	95
---------------------------------	-----------

11. DANKSAGUNG	114
-----------------------	------------

12. SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	115
-----------------------------------	------------

13. LEBENSLAUF	116
-----------------------	------------

1. Einleitung

Fettsäuren haben vielfältige Funktionen im menschlichen Organismus. Sie bilden die Struktur menschlicher Membrane, spielen eine große Rolle als intrazellulärer Energiespeicher und sind Ausgangspunkt für die Biosynthese biologisch aktiver Substanzen (Signalfunktion). Fettsäuren sind ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung, sie können aber auch vom Organismus selbst synthetisiert werden. Fettsäuren sind der wichtigste Energieträger des Körpers. Der Transport der im Cytosol vorkommenden freien Fettsäuren in das Mitochondrium zum Abbau und zur energetischen Verwertung der Lipide wird mit dem mitochondrialen Carnitin-Palmitoyltransferase-System bewerkstelligt.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Regulation der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1) in systemischen Entzündungszuständen. Hierbei wurde die Wirkung des Entzündungsmediators Stickstoffmonoxid (NO) auf die CPT 1 untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf den Einfluss von PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) auf die induzierbare NO-Synthase – dem verantwortlichen Enzym für die massive Produktion von NO in Entzündungsreaktionen- und damit auf die Regulation der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 gelegt.

Zum Abbau der Fettsäuren und zu deren energetischen Verwertung müssen die Fettsäuren in das Mitochondrium transportiert werden, da dort die Enzyme der β -Oxidation lokalisiert sind.

Dieser Transport geschieht mittels eines Transportproteinsystems, des mitochondrialen Carnitin-Palmitoyltransferase-Systems (CPT).

In Stoffwechselsituationen mit erhöhtem Energiebedarf reagiert der Organismus mit einer Erhöhung der Ketogenese. Im Endotoxinschock aber zeigt sich ein paradoxes Phänomen: Die Ketogenese wird inhibiert.

Die Untersuchung und das Verständnis der Regulation der CPT 1 kann zur Verbesserung der Energiebilanz und damit auch der Überlebensrate im Endotoxinschocks führen.

1.1. Das Carnitinsystem

Carnitin (β -Hydroxy- γ -Trimethylaminobutyrat) wurde erstmals 1905 isoliert. Mitte der fünfziger Jahre wurde die essentielle Rolle des Carnitins bei der Oxidation von langkettigen Fettsäuren in unabhängigen Studien belegt [3,4,5].

Langkettige Fettsäuren werden durch die Acyl-CoA-Synthetase aktiviert und -an Carnitin gebunden- in das Innere der Mitochondrien transportiert. Dieses Carnitin-Transportsystem besteht aus drei Enzymen. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1) ist an die Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran gebunden. CPT 1 katalysiert die Kopplung des Thioesters an L-Carnitin und damit die Umsetzung zum Acyl-Carnitin, während das Coenzym A wieder freigesetzt wird. Das Acyl-Carnitin passiert mit Hilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase die innere Mitochondrienmembran. An der Innenseite der mitochondrialen Innenmembran findet der umgekehrte Vorgang statt. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT 2) überträgt den Fettsäurerest des Acyl-Carnitins auf Coenzym A, wobei Acyl-CoA und freies Carnitin entsteht. An diese Reaktion schließt sich dann der intramitochondriale Abbau der Fettsäuren, die β -Oxidation an.

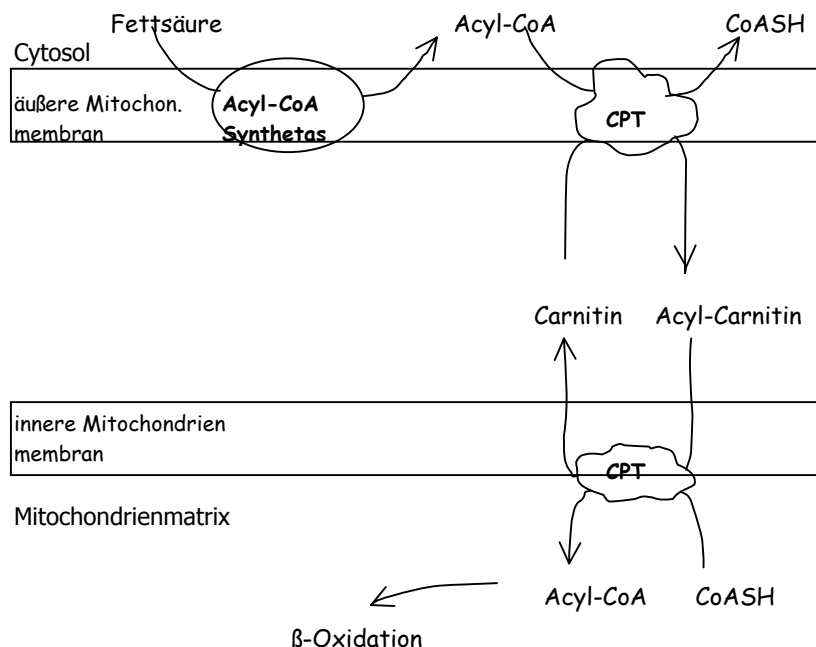


Abb. 1: Das mitochondriale Fettsäuretransport System

1.1.1. Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1)

Langkettige Fettsäuren repräsentieren die wichtigste Energieressource vieler Organe, insbesondere der Muskeln und der Leber. Die physiologische Bedeutung der CPT 1 liegt im Transport von aktivierten langkettigen Fettsäuren aus dem Cytosol durch die Mitochondrienmembran hindurch zum Ort der β -Oxidation. Sie ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der mitochondrialen Oxidation langkettiger Fettsäuren. Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers ist die Lokalisation von CPT 1 an der äußeren Mitochondrienmembran gelungen [13].

Es existieren zwei Isoformen der CPT 1, eine vom hepatischen (L-CPT 1) und eine vom muskulären Typ (M-CPT 1). Sie unterscheiden sich in Bezug auf den IC_{50} Wert für Malonyl-CoA und ihren K_m Wert für Carnitin [47,72,73,74]. Diese zwei Isoformen sind auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert [1,71]. Im folgenden wird besonders auf die für diese Arbeit wichtige L-CPT 1 eingegangen.

Die cDNA der CPT 1 konnte in den letzten Jahren aus zwei verschiedenen Spezies - Ratte [6] und Mensch [7] - kloniert werden. Die isolierte CPT 1-cDNA aus der Ratte zeigt eine Größe von 4765 bp. Das daraus abgeleitete CPT 1 Protein besteht aus 773 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 88 kDa [6,8]. Die Homologie auf Proteinebene zwischen Ratten und humaner CPT 1 liegt bei 88%. L-CPT 1 wird neben Leber und Herz auch in Niere, Lunge, Milz und Pankreas exprimiert [7]. Die Aktivität von CPT 1 ist physiologischer Weise durch eine Reihe pharmakologischer Substanzen, wie z.B. Malonyl-CoA, Etomoxir und Tetradecylglycinsäure hemmbar [6].

L-CPT 1 wird in der fötalen und neonatalen Ratte sehr hoch exprimiert und nimmt während der voranschreitenden Entwicklung ab. Diese Abnahme geht einher mit der Akkumulation von Carnitin im wachsenden Herzen der Ratten [14]. Eine hohe CPT 1 Aktivität kann auf eine vorwiegend fetthaltige Diät zurückgeführt werden, dagegen führt eine kohlenhydratreiche Ernährung zum Rückgang der CPT 1 Aktivität [78]. Eine transkriptionelle Regulation der CPT 1 konnte insulinabhängig bei hungrigen diabetischen Ratten gezeigt werden [15]. Mit Dibutyryl-cAMP stimulierte Hepatozyten zeigten eine dosisabhängige Steigerung der CPT 1 mRNA Expression, die durch Insulin gehemmt werden konnte. Stimulationen mit dem CPT 1 Inhibitor

Tetradecylglycinsäure alleine zeigten keinen Effekt, in Kombination mit Fettsäuren verstärkte sich die stimulierende Wirkung von langkettigen Fettsäuren [80].

Gulick et al. konnten zeigen, dass die regulatorische Wirkung von Fettsäuren über PPAR vermittelt wird. Funktionelle PPRE's (peroxisome proliferator response elements) konnten in der Promotor-Region von Enzymen, die in den Fettstoffwechsel involviert sind, identifiziert werden [33,81,69,70,49]. Untersuchungen mit Lebern von hyperthyroiden, euthyroiden und hypothyroiden Ratten zeigten eine vermehrte CPT 1 mRNA Expression mit einhergehender Aktivitätssteigerung bei den hyperthyroiden, hingegen einer Abnahme bei den hypothyroiden Tieren [82].

1.1.2. Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT 2)

Die isolierte cDNA aus der Ratte kodiert für ein Protein, welches aus 658 Aminosäuren (Ratte, Mensch) [75] besteht und ein Molekulargewicht von 71 kDa hat [9,10,11,12]. Die mRNA hat eine Größe von ~2,5 kb. CPT 2 ist im Gegensatz zu CPT 1 Lösungsmittel sensitiv und kann ohne Verlust der Aktivität leicht mit milden Detergenzien von der inneren Mitochondrienmembran gelöst werden. CPT 2 lässt sich nicht durch Malonyl-CoA hemmen. CPT 2 und Carnitin-Acylcarnitintranslokase haben keinen regulatorischen Einfluss auf die mitochondriale Fettsäure Aufnahme [76-79]. Von der Carnitin-Palmitoyltransferase 2 existieren keine Isoenzyme

1.2. Stickstoffmonoxid (NO)

Die NO-Synthase (NOS) katalysiert die Umsetzung von L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch in Citrullin unter Entstehung von NO. Molekulare Untersuchungen haben die Existenz von drei NO-Synthasen gezeigt. Man unterscheidet die konstitutiv exprimierten NO-Synthasen in endothelialen Zellen (eNOS) und in neuronalen Zellen (nNOS). Darüber hinaus existiert eine induzierbare NO-Synthase (iNOS), die durch inflammatorische Zytokine, wie Interleukin 1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Endotoxin induziert werden kann [16,17]. Allen NO-Synthasen gemeinsam ist die Abhängigkeit von NADPH,

Tetrahydrobiopterin, FAD und FMN. Durch Phosphorylierung, die durch Proteinkinasen katalysiert wird, kann die Aktivität der NO-Synthasen erhöht oder vermindert werden.

NO aktiviert die Guanylat-Cyclase durch Bindung des Stickstoffmonoxid an das Eisenatom der Hämgruppe des Enzymes. Durch diese Bindung wird das aktive Zentrum der Guanylat-Cyclase in die Lage versetzt, aus Guanosintriphosphat (GTP) cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) zu bilden. Dies führt nachfolgend zur Relaxation der glatten Muskulatur und damit zur Vasodilatation. Dieser Wirkmechanismus ist das therapeutische Prinzip aller NO-freisetzenden Vasodilatoren wie Nitroprussit oder dem zur Behandlung von koronaren Herzkrankheiten eingesetzten Nitroglycerin.

Stickstoffmonoxid in hohen Dosen kann direkt toxisch wirken, indem es die DNA schädigt [19]. Auf diese Weise kann die bakterizide, tumorizide und fungizide Wirkung von NO erklärt werden. Darüber hinaus beeinträchtigt NO auch die Schlüsselenzyme der DNA Synthese und der DNA-Reparatur. Freigesetztes NO, gebildet nach Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase durch Makrophagen, spielt eine große Rolle bei der Abwehr von Viren und Bakterien [18].

Der erste Hinweis auf eine Regulation der CPT 1 durch Stickstoffmonoxid wurde 1996 beschrieben. Nach Fütterung von Ratten mit L-NMMA, einem spezifischen Inhibitor der NO-Synthasen, konnte eine signifikante Abnahme der Ketogenese beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten die Tiere eine Hypertriglycerinämie und Hypercholesterinämie, was Khedara et. al. auf eine Abnahme der CPT 1 Aktivität zurückführten [28].

1.2. Stickstoffmonoxid und Entzündungsreaktionen

Viele Entzündungsreaktionen zeichnen sich durch eine massive Produktion von NO aus. Entzündungsreaktionen gehen u.a. einher mit Änderungen der Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Das inflammatorische System wird in pro- und anti-inflammatorische Komponenten unterschieden. Die Dysregulation dieses

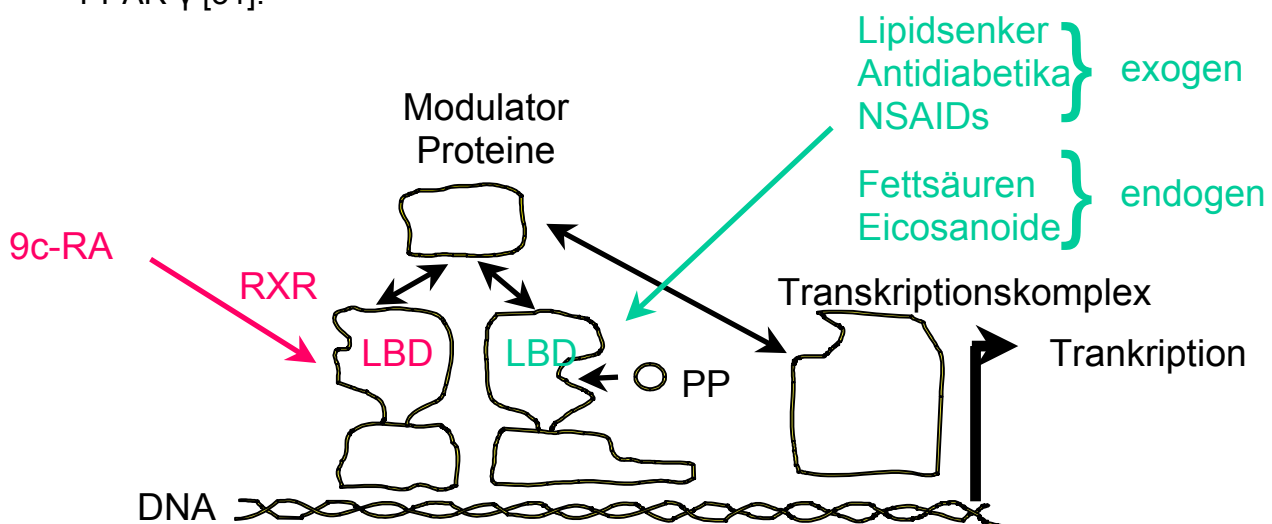
Systems ist für die Ausbildung des Multiorganversagens verantwortlich. Interleukin 1 β gehört zu der Gruppe der Zytokine und wird u. a. von Makrophagen und Monozyten gebildet. Es dient dem Auslösen der Immunantwort in der akuten Phase. IL-1 β , sowie TNF- α , IFN- γ und LPS induzieren die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), was nachfolgend zu erhöhten Bildung von NO führt. Auch IL-2, IL-12, IL-18 und INF- α wurden als Stimulatoren der iNOS beschrieben [18]. Für die Induktion von iNOS durch IL-1 β in Mesangiumzellen ist die Bindung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor κ B) an der potentiellen Bindungsstelle im iNOS Promotor notwendig [22]. NO inhibierende Reagenzien basieren auf einer verminderten Bindung von NF κ B an dieser Bindestelle. Dies konnte für verschiedene pharmakologische Substanzen, wie Dithiocarbamat [22], Dexamethason [20,23,24] und Cyclosporin [25,26] gezeigt werden. Neben NF κ B spielt ebenfalls CAAT/enhancer binding protein (C/EBP) eine Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle der iNOS durch Zytokine und cAMP. Die iNOS Expression zeigt nach einer Zytokinstimulation einen verzögerten Beginn der Transkription nach vier Stunden mit darauf folgender mehr als 24-stündiger immensen mRNA Synthese. Das kann nicht auf NF κ B und C/EBP alleine zurückgeführt werden. Der Untersuchung dieses verzögerten und verlängerten Effektes lag die Hypothese zugrunde, dass die Zytokin-induzierte iNOS Transkription zuerst durch NF κ B und C/EBP ausgelöst und anschließend durch andere Mediatoren verlängert und verstärkt wird.

1.4. PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor)

PPARs sind Regulatoren der Lipid-Homöostase. Es ist eine durch Liganden aktivierte Rezeptorfamilie die ihrerseits zur Familie der Kernrezeptoren gehört. PPARs binden gesättigte und ungesättigte Fettsäuren und deren Metaboliten. 1990 wurde ein Mitglied der Superfamilie der Kernrezeptoren aus der Spezies Maus kloniert, der peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) genannt wurde [43]. Es konnten bisher drei PPAR Subtypen identifiziert werden: PPAR- α , PPAR- β und PPAR- γ .

PPAR- α reguliert hauptsächlich den Fettsäure-Katabolismus und ist in Leber, Niere und Darm stark exprimiert, hingegen spielt PPAR- γ eine Rolle in der Speicherung von Fettsäuren im Fettgewebe. PPARs haben eine DNA-bindende Domäne und eine Liganden-bindende Domäne. PPARs werden durch Liganden oder Hitzeschockprotein 72 aktiviert und bilden mit dem Retinolsäurerezeptor RXR- α (9cis-retinoic acid receptor) ein Heterodimer, das dann mit dem PPRE (peroxisome proliferator responsive element) im jeweiligen Ziel-Gen interagiert. In der Folge kommt es zur transkriptionellen Aktivierung des Ziel-Gens, was dann in der Proteinsynthese und den damit verbundenen biologischen Effekten mündet. Natürliche Liganden der PPAR's sind Fettsäuren und deren Derivate sowie Leukotriene und Prostaglandine.

Darüber hinaus haben PPAR's auch pharmakologische Liganden. Wy 14643 ist eine chemische Verbindung (4-Chloro-6-(2,3-xylyldino)-2-pyrimidinylthioacetic Acid) und ein potenter Ligand, der PPAR- α aktiviert. Ebenso sind Bezafibrat und Clofibrat in der Lage, PPAR- α zu stimulieren [34]. Die Gruppe der Glitazone (Troglitazon, Ciglitazon) sind dagegen Liganden von PPAR- γ [35]. Einige nicht-steroidale anti-inflammatorische Substanzen (Indomethacin, Ibuprofen) binden an PPAR- α und PPAR- γ [31].



nach Corton et al. Annu. Rev.
Pharmacol. Toxicol. 1999
40:491-518

Abb. 2: Struktur des PPAR-RXR Komplexes

1.5. Ziel der Arbeit

Kernziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob Stickstoffmonoxid (NO) einen Einfluss auf die Regulation der CPT 1 Expression und Aktivität hat.

In diesem Kontext wurde auch die Wirkung des peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR- α) auf die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und damit auf die Generierung von NO untersucht.

2. Material

2.1. Geräte

Sorvall Kühlzentrifuge RC 5B, Fa. Du Pont Instruments, Bad Nauheim

Eppendorf-Tischzentrifugen Typ 5412 S und 3200, Fa. Eppendorf – Netheler GmbH, Hamburg

GeneQuant, Pharmacia, Freiburg

LS 6500 Multi-purpose Scintillation Counter, Fa. Beckmann, USA

Milliporeanlage „Milli-Q“, Fa. Millipore, Neu-Isenburg

Ultraviolettstrahler, Fa. Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg

PCR-Cycler 9700, Fa. Perkin-Elmer, Weiterstadt

Semidry Blotting Apparatur, Fa. Bio-Rad, München

AutoLumat, Fa. Bethold, Wildbad

ABI Prism TM310 Genetic Analyser, Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt

GelDoc 100, Fa. Bio-Rad, München

Microplate Reader, Fa. Bio-Rad, München

2.2. Chemikalien und Labormaterial

Fa. Alexis, Grünberg

1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolat (DETA NONOate)
S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP)
NG-monomethyl-L-arginin (L-NMMA)
N-(3-(aminoethyl)benzyl)acetamidin dihydrochlorid (1400W)

Fa. Amersham Pharmacia, Freiburg

ECL-Nachweissystem
 α -³²P-dCTP
„ready prime“ DNA labelling kit
Sequenzanalyse Kit (Big dye Terminator Premix, Template Suppression Reagent)

Calbiochem, Bad Soden

Wy 14643
Ly 171883
DHA (Docosahexaensäure)

Cell Concepts, Umkirch

IL-1 β

Clontech, Heidelberg

Kit zur Klonierung von genomischer DNA

Fa. Eastman Kodak Company, Rochester, New York, 14650, USA:

Entwickler D19
Fixierer unifix
Röntgenfilme Kodak X-OMATTMAR

Zellkultur Plastik Reagenzien

Fa. Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu-Ulm:

Ethidiumbromid

Fa. Gibco/BRL-Bethesda Research Laboratories GmbH, Eggenstein:

Zellkultur Medien und Seren

Fa. Merck, Darmstadt

Griess Reagenz

Fa. Millipore, Eschborn

PVDF Membran

NEN Life Science, Köln

Nylon blotting Membran

Fa. Novartis, Pharma Inc., Basel

IL-1 β

Fa. Promega:

Proteinmarker

Luciferase Reporter Assay

Fa. Qiagen, Hilden

Transfektionsreagenzien (EC-Puffer, Effectene, Enhancer)

QIAquick Gelextraktionskit

Fa. Roche, Mannheim:

RT-PCR Reagenzien

Fa. Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Sekundärer Antikörper anti-rabbit IgG HRP

Fa. Schleicher und Schuell, Dassel

Nylonmembran

Whatmanpapier

Fa. Sigma-Chemie, Deisenhof:

alle übrigen Reagenzien und Salze

2.3. Enzyme

2.3.1. Restriktionsenzyme

BAMH I	G'GATCC	aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Fa. Roche
BGL II	A'GATCT	aus <i>Bacillus globigii</i>	Fa. Roche
ECO RI	G'AATTC	aus <i>Escherichia coli</i> RY 13	Fa. Roche
ECO RV		aus <i>Escherichia</i>	Fa. Roche
KPN I	GGTAC'C	aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fa. Roche
MLU I	A'CGCGT	aus <i>Micrococcus luteus</i>	Fa. Roche
SAC I	GAGCT'C	aus <i>Streptomyces</i> <i>achromogenes</i>	Fa. Roche
SAL I	G'TCGAC	aus <i>Streptomyces albus</i> G	Fa. Roche
SPH I	GCATG'C	aus <i>Streptomyces</i> <i>phaeochromogenes</i>	Fa. Roche
XHO I	C'TCGAG	aus <i>Xanthomonas holcicola</i>	Fa. Roche

2.3.2. DNA/RNA-Polymerasen

Taq-DNA-Polymerase	aus <i>Thermus aquaticus</i>	Fa. Roche
T ₇ -RNA-Polymerase	aus Phagen	Fa. Roche

2.3.3. Sonstige Enzyme

RNase-Inhibitor	Fa. Roche
RNase A (aus Rinderpankreas)	Fa. Roche
RNase I	Fa. Roche
DNase I	Fa. Roche
T ₄ -DNA-Ligase	Fa. Roche

2.4. Plasmide

pGI3-basic Promega

topo-Vektor Promega

PCR-Primer für CPT1, Eurogentec

CPT1-F (1-27)

Sequenz: 5'-ATGGCAGAGGCTCACCAAGCTGTGGCC-3'

CPT1-B (340-366)

Sequenz: 5'-CATGGTCATGATGACTGCCACCCAGAG-3'

PCR-Primer für GAPDH, Eurogentec

GAPDH-F

Sequenz: 5'-GACCACAGTCCATGACATCACT-3'

GAPDH-B

Sequenz: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'

PCR-Primer für CPT 1 Promotorklonierung, Eurogentec

CPT1 disextern (2565-2591)

Sequenz: 5'-GTAAGTCCAGCTCCTGGATCTAGTGC-3'

CPT1 disintern (2693--2718)

Sequenz: 5'-GCTTCCTGCCTCACCTGTTTCCTCTA-3'

CPT1 extern (6075-6950)

Sequenz: 5'-TCACGCGTACCCACGGGCACAGTCT-3'

CPT1 intern (6928-6903)

Sequenz: 5'-AAGGTGATACCAGCGCGCCCAGTTCA-3'

PCR-Primer für PPAR Mutagenese, Eurogentec

Mut 1f (1314-1342)

Sequenz: 5'-CACATGTGGAGCACAGGGGACAATTTATG-3'

Mut1r (1314-1342)

Sequenz: 5'-CATAAATTGTCCCCTGTGCTCCACATGTG-3'

Primer für Electro-Mobility-Shift-Assay, Eurogentec

DHS1 (1310-1330)

Sequenz: 5'-CTGACCAATTGACTGGTATG-3'

DHS1 r (1310-1330)

Sequenz: 5'-GAACCTACACGGTGGAAGGA-3'

Oligo für Electro-Mobility-Shift-Assay, Eurogentec

PPAR

Sequenz: 5'-CAAACTAGGTCAAAGGTCA-3'

PPARr

Sequenz: 5'-TGACCTTTGACCTAGTTTTG-3'

NFκB

Sequenz: 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'

NFκBr

Sequenz: 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'

2.5. Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden aus Gründen der Arbeitserleichterung häufig als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und erst vor Gebrauch mit Aqua bidest auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt.

Zum Schutz vor Kontamination wurden die Lösungen wenn möglich 15 min bei 121°C und 1,3 bar autoklaviert.

2.5.1. Nährmedium zur Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen

2 YT-Medium:

16g	Pepton
10g	Hefeextrakt
5g	NaCl
1	NaOH-Plätzchen

ad 1 l mit Aqua bidest.

2 YT Platten:

Zugabe von 15 g Agar-Agar

2.5.2. Medium für *E.coli*-Kulturen

LB-Medium:

5	g	Hefeextrakt
5	g	NaCl
10	g	Pepton
5	ml	1N NaOH

ad 1 l mit Aqua bidest.

LB-Platten:

Zugabe von 15 g Agar-Agar und Ampicillin (50 µg/ml) als Selektionsmarker.

2.5.3. Lösungen zur Plasmidpräparation

TE-Puffer:

10	mM	Tris (pH 8,0)
1	mM	EDTA (pH 8,0)

Lysozym-Puffer:

50	mM	Glucose
10	mM	EDTA
25	mM	Tris (pH 8,0)

Na-Acetat (3M) mit 100% Essigsäure auf pH 4,8-5,2 eingestellt

K-Acetat (3M) mit 100% Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt

RNase A:

10 mg/ml

30 min bei 95°C zur Inaktivierung von DNasen inkubieren.

2.5.4. Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

50 X TAE-Puffer(pH 8,5):

242 g Tris

57,1 ml Eisessig

37,2 g Na₂EDTA X 2 H₂O

ad 1 l mit Aqua bidest

Sucrosemarker:

40 % Sucrose

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol

χ DNA-BstE II-Größenmarker:

702, 1264, 1371, 1929, 2323, 3675, 4324, 4822, 5686, 6369, 7242, 8454 bp

2.5.5. Lösungen für RNA-Isolation

Guanidinium-thiocyanat

25 g Guanidinium-thiocyanat

0,25 g N-Lauroylsarcosin

0,75 ml 1 M Natriumacetat (pH 7,0)

0,35 ml β-Mercaptoethanol

27 ml Aqua bidest

2.5.6. Lösungen für SDS-PAGE

10 %iges Trenngel nach Laemmli:

16	ml	Acrylamid Mix (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
10	ml	Trenngelpuffer (1,5 M Tris, pH8,8 mit HCl eingestellt)
13,2	ml	Aqua bidest
400	µl	10% SDS
400	µl	10% Ammoniumpersulfat (APS)
16	µl	Tetramethyldiamin (TEMED)

5%iges Sammelgel nach Laemmli:

1,7	ml	Acrylamid Mix (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)
1,25	ml	Sammelgelpuffer (0,5 M Tris, pH 6,8 mit HCl eingestellt)
6,8	ml	Aqua bidest
100	µl	10% SDS
100	µl	APS
10	µl	TEMED

10 x Laufpuffer:

0,25	M	Tris
1,92	M	Glycerin
1	%	SDS

Laemmli-Puffer:

100	mM	Tris-HCl pH 6,8
4	%	SDS
2	%	β-Mercaptoethanol
20	%	Glycerin
0,002	%	Bromphenolblau

Towbin-Transfer-Puffer

25	mM	Tris
192	mM	Glycin (pH 8,3)
20	%	Methanol

Coomassie-Färbelösung:

50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Eisessig
0,1 % (v/v) Coomassie-Blau

Entfärbelösung:

10 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

2.5.7. Lösung für immunologischen Nachweis von ProteinenTris buffered saline/Tween:

50 mM Tris
150 mM NaCl
pH 7,4 mit HCl eingestellt
0,05 % Tween 20

2.5.8. Lösungen zur ProteinextraktionHomogenisationspuffer:

20 mM Tris-HCL (pH 7,5)
1 mM EDTA (pH 8,0)
1 mM EGTA (pH 8,0)
1 % Triton X100
2 mM Dithiothreitol
50 mg/ml Leupeptin
1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid

2.5.9. Lösungen zur Präparation von nuklearen Zellextrakten

Puffer A

10	mM	Hepes (pH 7,9)
1,5	mM	MgCl ₂
10	mM	KCl

Puffer B

20	mM	Hepes (pH 7,9)
25	%	Glycerol
0,02	M	KCl
1,5	mM	MgCl ₂
0,2	mM	EDTA

Puffer C

20	mM	Hepes (pH 7,9)
25	%	Glycerol
1,2	M	KCl
1,5	mM	MgCl ₂
0,2	mM	EDTA

allen Puffern wird kurz vor Gebrauch 0,5 mM DTT und 0,5 mM PMSF zugesetzt

Dialyse-Puffer

20	mM	Hepes (pH 7,9)
20	%	Glycerol
100	mM	KCl

2.5.10. Lösungen zur Präparation von intakten KernenPuffer I

0,32	M	Sucrose
3	mM	CaCl ₂
2	mM	Magnesiumacetat
0,1	mM	EDTA
0,1	%	Triton X 100
1	mM	DTT
10	mM	Tris-HCL (pH 8,0)

Puffer II

2	M	Sucrose
5	mM	Magnesiumacetat
0,1	mM	EDTA
1	mM	DTT
10	mM	Tris-HCl (pH 8,0)

Puffer D

60	mM	KCl
15	mM	NaCl
70	mM	MgCl ₂
2,5	mM	CaCl ₂
2,5	mM	DTT
15	mM	Tris-HCl (pH 8,0)

Aufbewahrungspuffer

25	%	Glycerol
5	mM	Magnesiumacetat
0,1	mM	EDTA
5	mM	DTT
50	mM	Tris-HCl (pH 8,0)

2.5.11. Lösungen für Mobility-Shift DNA-Binding Assay5 X TBE-Puffer

54 g Tris
27,5 g Borat
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1l Aqua bidest

3 X Bindingpuffer

12 % Ficoll
60 mM Hepes (pH 8,0)
150 mM KCl
3 mM EDTA
3 mM DTT
0,75 mg/ml BSA

2.5.12. Lösungen für Northern-BlotDenaturierungslösung

500 µl Formamid
162 µl 37% Formaldehyd
100 µl 0,2 M MOPS

10 X SSC-Puffer

1,5 M Natriumchlorid
0,15 M Natriumcitrat

Hybridisierungslösung

2,5 ml Formamid
0,5 ml 20 X SSC
0,5 ml 10% SDS
1,5 ml Aqua bidest

Waschpuffer 1

2	x	SSC
---	---	-----

0,1	%	SDS
-----	---	-----

Waschpuffer 2

0,2	x	SSC
-----	---	-----

0,1	%	SDS
-----	---	-----

2.6. Antibiotika

Ampicillin: 50 mg/ml in Aqua bidest; Lagerung bei –20°C

2.7. Medien für ZellkulturPBS-Puffer:

137	mM	NaCl
-----	----	------

4,3	mM	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O
-----	----	--

2,7	mM	KCl
-----	----	-----

1,4	mM	KH ₂ PO ₄
-----	----	---------------------------------

RPMI-Medium

10	%	FCS
----	---	-----

2	mM	Glutamat
---	----	----------

5	ng/ml	Insulin
---	-------	---------

100	U/ml	Penicillin
-----	------	------------

100	µg/ml	Streptomycin
-----	-------	--------------

DMEM-Medium

0,1	mg/ml	Fettsäurefreies BSA
-----	-------	---------------------

100	U/ml	Penicillin
-----	------	------------

100	µg/ml	Streptomycin
-----	-------	--------------

Trypsin-EDTA

3. Methoden

Molekularbiologische Methoden

3.1. Erzeugung kompetenter Zellen (*E. coli* XL1-blue)

Escherichia coli Zellen sind gramnegative, stäbchenförmige Bakterien, die natürlicherweise im Dickdarm von Wirbeltieren vorkommen. Ihre Generationszeit beträgt bei optimalen Bedingungen (komplexes Medium, 37°C) 20 Minuten. *E.coli*-Zellen besitzen eine Zellwand, die das Zytoplasma, DNA, RNA, Zellorganellen und Proteine umschließt. *E.coli* ist molekularbiologisch-genetisch sehr gut untersucht. *E.coli*-Zellen, die molekularbiologisch Verwendung finden, sind hinsichtlich ihrer Anheftungsmechanismen über Oligosaccharidstrukturen (Fimbrien) so verändert, dass diese sich nicht mehr an menschliche Darmepithelzellen anhaften können. Für die DNA-Aufnahme werden *E.coli*-Zellen einer Behandlung mit eiskalter $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ unterzogen, was zur Folge hat, dass die Plasmide sehr wirksam aufgenommen werden können [27]. Die aufgenommenen Plasmide vermehren sich dann autonom.

Durchführung:

5 ml 2YT-Medium werden mit Antibiotika (Tetracyclin, 12,5 µg/ml) versetzt und aus der Dauerkultur mit *E. coli* XL1-blue angeimpft. Die Kultur muss bei 37°C über Nacht wachsen. 4 ml dieser ON-Kultur (Over-Night-Kultur) werden auf 400 ml 2YT-Medium (2.5.1.) überimpft und bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Die Kultur muss bis zu einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von höchstens 0,375 wachsen. Die OD-Bestimmung erfolgt gegen leeres Medium. Die Zellen befinden sich hier in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach Erreichen der gewünschten OD überführt man die Kultur steril in 50 ml Portionen und pelletiert die Zellen bei 2000 rpm (GSA-Rotor), 4°C für 10 min. Das Pellet wird in 10 ml eiskalter 0,1 M $\text{CaCl}_2/0,02$ M MgCl_2 resuspendiert und erneut bei 4°C, 2000 rpm 10 min zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird abermals gelöst (s.o.) und 30-60 min auf Eis ruhen gelassen. Danach erfolgt der letzte Zentrifugationsschritt bei 4°C, 2000 rpm für 10 min. Die pelletierten Zellen werden in 2 ml eiskalter 0,1 M $\text{CaCl}_2/0,02$ M $\text{MgCl}_2/15\%$ Glycerin Lösung

aufgenommen, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen können bei -80°C aufbewahrt werden.

3.2. Transformation von kompetenten *E.coli*-Zellen

Durch die oben beschriebene Behandlung der *E.coli*-Zellen werden diese zur Aufnahme von Fremd-DNA (z.B. Plasmide) befähigt. Die Aufnahme erfolgt hierbei durch Hitzeschock [37]. Die Fremd-DNA kann dann autonom, d.h. unabhängig von der Zellteilung, repliziert werden, so dass die gewünschte DNA in großen Mengen gewonnen werden kann. Auf den molekularbiologisch verwendeten Plasmiden befindet sich in der Regel ein Bereich, der für eine Antibiotikaresistenz codiert. Zellen, die in einem antibiotikahaltigen Medium wachsen, sind somit gezwungen, das Plasmid mitzuvermehren.

Durchführung:

Zu 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E.coli*-Zellen werden 25-50 ng (10-20 des Ligationsansatzes) gegeben. Der Ansatz wird vorsichtig gemischt und 20-30 min auf Eis inkubiert. Hierbei lagert sich die DNA außen an die Zellmembran der Bakterien an. Durch den anschließend folgenden Hitzeschock (90 sek ; 42°C) dehnen sich die Zellen aus. Die folgende Inkubation für 5 min auf Eis bewirkt das Zusammenziehen der Zellmembran. Dadurch gelangt die angelagerte DNA in das Zellinnere. 500 µl Antibiotika freies Medium werden zugegeben, vorsichtig gemischt, und 60 min bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion der transformierten Zellen wird auf Antibiotika haltige 2YT-Platten (2.5.1.) je 100µl IPTG und XGAL verteilt, die *E.coli*-Kultur ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Falls *E.coli*-Zellen die Fremd-DNA aufgenommen haben, können diese aufgrund ihrer erworbenen Antibiotikaresistenz wachsen und somit Kolonien bilden.

Durch Animpfen der einzelnen Kolonien in einer Über-Nacht-Kultur (35.3.) kann das Plasmid präpariert und isoliert sowie nach einem Restriktionsverdau (3.5.) gelelektrophoretisch aufgetrennt (3.6.) und analysiert werden.

3.3. Ansetzen einer Über-Nacht-Kultur (ON-Kultur)

Diese Methode dient der Vermehrung plasmidhaltiger *E.coli*-Zellen. Die transformierten *E.coli*-Zellen, welche die gewünschte Fremd-DNA enthalten, werden über Nacht (15 Stunden) in einem Medium mit dem der jeweiligen Resistenz zugesetzten Antibiotikum angeimpft. So vermehren die Zellen zwangsläufig das erworbene Plasmid mit, denn nur dieses ermöglicht ihnen das Überleben in dem Antibiotika haltigen Medium. Die erhaltene Kultur ermöglicht dann die Isolierung der darin enthaltenen DNA (3.4.2.) sowie die Herstellung einer Glycerin-Dauerkultur (3.11.).

Durchführung:

Das Medium wird steril in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin) versetzt. Von einer Agarplatte oder aus einer Dauerkultur kratzt man einige Bakterien ab und überführt diese in das vorbereitete Medium. Die Zellen schütteln über Nacht bei 37°C und 225 rpm und vermehren sich dort. Am nächsten Morgen kann aus diesen Bakterien die Plasmid-DNA (3.4.2.) isoliert werden.

3.4. Plasmidpräparation

3.4.1. Plasmide

Plasmide sind zirkulär doppelsträngige, im Zytoplasma vorkommende DNA-Fragmente, die nur wenige Gene enthalten und als unabhängige Einheit repliziert werden.

Ein Plasmid (Vektor) enthält eine Multiple Klonierungsstelle (MCS), in dessen Sequenzbereich Schnittstellen für Restriktionsenzyme, die das Plasmid nur einmal schneiden, liegen. Dieser Sequenzbereich ermöglicht die Insertierung von Fremdgenen. Die beidseitig der MCS befindlichen Promotoren kontrollieren in vitro die Transkription der Fremdgene. Zusätzlich enthalten Plasmide solche Gene, die für Antibiotikaresistenzen codieren. Diese Gene dienen der Selektion der transformierten Zellen.

3.4.2. Plasmidpräparation

Die Isolierung des Plasmides aus transformierten *E.coli*-Zellen erfolgt mittels alkalischer Zelllyse [5]. Durch Zugabe von NaOH/SDS kommt es zur Zerstörung der Zellwand und der gleichzeitigen Denaturierung der DNA. Die Anwesenheit einer sauren Salzlösung (K-Acetat) führt zur Renaturierung der DNA, wobei dieser Vorgang bei der kleineren Plasmid-DNA schneller vonstatten geht. Die Abtrennung der genomischen DNA sowie der ausgefallenen Proteine geschieht mittels Zentrifugation. Die erhaltene Plasmid-DNA wird anschließend mit 100%igem Ethanol bei -20°C gefällt. Die durchschnittliche Ausbeute einer guten Mini-Präparation liegt bei 10 µg DNA/2 ml Zellkultur.

3.4.2.1. Plasmidpräparation aus 2ml Über-Nacht-Kultur (Mini-Präp)

Diese Methode dient der Gewinnung kleinerer Mengen der Plasmid-DNA, die zum Kontrollrestriktionsverdau eingesetzt wird.

Durchführung:

Die in dem entsprechenden Medium angeimpfte Über-Nacht-Kultur wird im 2 ml Eppendorf-Gefäß bei 13000 rpm 20 Sekunden pelletiert, der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 100 µl TE-Puffer resuspendiert. Darauf erfolgt die Zugabe von 200 µl 0,2 N NaOH/1% SDS. Bei diesem Schritt müssen die Kulturen 5 min auf Eis ruhen. Nach der Zugabe von 150 µl Kalium-Acetat (2.5.3.) werden die Proben erneut für 5 min auf Eis inkubiert und danach bei 13000 rpm 5 min zentrifugiert. Die in dem Überstand befindliche Plasmid-DNA überführt man in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 700 µl eiskaltem 100 %igem Isopropanol.

Nach Pelletierung mittels Zentrifugation bei 13000 rpm, 4°C und 20 min wird die so erhaltene Plasmid-DNA zum Lösen der restlichen Salze mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation für 15 min muss der Überstand abgenommen und das Pellet bei 37°C getrocknet werden. Das getrocknete DNA-Pellet kann nun in 20 µl sterilem Aqua bidest aufgenommen werden. Die Plasmid-DNA liegt jetzt für nachfolgende Kontrollrestriktionsverdaue fertig vor, wobei hier gewöhnlich 1-2 µl der DNA eingesetzt werden. Die DNA kann auch bei -20°C gelagert werden.

3.4.2.2. Plasmidpräparation aus 50-200 ml Über-Nacht-Kultur (Midi-Präp)

Das Prinzip entspricht dem der Mini-Präparation, wobei man bei der Midi-Präparation eine größere Menge, 50-200 ml *E.coli*-Kultur bearbeitet und so eine erhöhte Ausbeute an Plasmid-DNA erhält (ca. 100-500 µg DNA/50 ml Kultur), die anschließend einem präparativen Restriktionsverdau (3.5.2.) zugeführt werden kann. Eine mit dieser Methode präparierte DNA zeichnet sich gegenüber dem Mini-Präp durch größere Reinheit aus.

Durchführung:

Die Über-Nacht-Kultur wird in ein 50 ml Polycarbonatgefäß überführt und bei 4000 rpm (SS34-Rotor) und 4°C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 4 ml Lysozym-Puffer (6.6.3.) sorgfältig gelöst. Durch die Zugabe von 4 ml 0,2 N NaOH/1% SDS erfolgt die Zellyse für 10 min auf Eis. Man pipettiert 4 ml Na-Acetat pH 5,2 (2.5.3.) zu, worauf die Renaturierung der Plasmid-DNA erfolgt. Dieser Vorgang ereignet sich in 10 min bei Inkubation auf Eis. Nun muss die Plasmid-DNA von der genomischen DNA abgetrennt werden. Die Abtrennung geschieht in der Kühlzentrifuge bei 10000 rpm für 20 min. Danach wird der Überstand abgenommen und über einen Filter in die equilibrierten Qiagen Röhrchen gefüllt. Die Röhrchen werden zweimal mit 30 ml QC Puffer gewaschen, anschließend wird die DNA mit 5 ml QBT-Puffer eluiert. Die Fällung wird in 5 ml eiskaltem, absolutem Isopropanol und einer Zentrifugation bei 15000 rpm, 4°C für 20 min durchgeführt. Das Pellet wird in 1ml 70% igem Ethanol gewaschen, zentrifugiert und in einer geeigneten Menge Aqua bidest aufgenommen.

Die Plasmid-DNA liegt nun in ausreichender Menge vor und kann bei -20°C aufbewahrt werden. Der Plasmidpräparation schließt sich ein analytischer Restriktionsverdau (3.5.1.) und eine Messung der erhaltenen DNA-Konzentration.

3.5. Restriktionsverdau

3.5.1. Analytischer Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, welche die Phosphodiesterbindungen im Inneren eines DNA-Moleküls an genau definierten Stellen hydrolysieren. Sie erkennen hierbei eine ganz spezifische DNA-Sequenz von vier bis acht Nukleotiden mit Palindrom-Struktur.

1 Einheit (Unit) Enzym schneidet hierbei bei seinem Temperaturoptimum 1 µg DNA.

Allgemein gibt es zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme:

- Enzyme, die bei der Spaltung glatte Enden erzeugen (blunt-end)
- Enzyme, die bei der Spaltung überhängende Enden erzeugen (sticky-end)

Zur Konzentrationsabschätzung der DNA wird ein Aliquot dieser DNA mit einem Enzym geschnitten, welches das Plasmid nur einmal schneidet (z.B. ein Enzym der MCS).

Für den analytischen Verdau wird im Allgemeinen 1/10 des vorliegenden DNA-Volumens eingesetzt.

Durchführung:

x µl Plasmid DNA

1 µl 10x Reaktionspuffer

ev. BSA

¼ U Restriktionsenzym

auf ein Volumen von 10 µl mit sterilem Aqua bidest auffüllen.

Der Reaktionsansatz inkubiert bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des gewählten Enzyms für 60 Minuten im Wasserbad.

3.5.2. Präparativer Restriktionsverdau

Einem präparativen Restriktionsverdau geht zur Identifizierung und Konzentrationsabschätzung immer ein analytischer Restriktionsverdau voraus. Mit dem präparativen Verdau wird die DNA in einer höheren Konzentration für nachfolgende Methoden vorbereitet.

Durchführung:

x µg DNA

1 µl 10x Restriktionspuffer

x U Restriktionsenzym

ad 20 µl mit Aqua bidest.

Anschließend wird der Restriktionsverdau durch Auftrag eines Aliquots auf ein Agarosegel (3.6.1.) kontrolliert.

3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren tragen eine negative elektrische Ladung (Phosphatgruppen) und wandern aufgrund deshalb im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Agarose ist ein Polysaccharid, das im Gel netzartige Strukturen bildet, durch welche die DNA-Moleküle wandern. Kleine Moleküle bewegen sich darin schneller als größere, was dazu führt, dass die DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

Das Agarosegel wird zusätzlich mit Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die α -Helix der DNA-Stränge und macht so die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar. Ein gleichzeitig aufgetragener λ -Marker, ermöglicht die Größen-Identifizierung der Proben.

3.6.1. Agarose-Gel

Für ein 1%iges Agarosegel wird 1g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer (2.5.4.) versetzt und bis zu dessen Auflösung erhitzt. Nach dem Abkühlen fügt man 0,7 µl Ethidiumbromid hinzu und gießt das Gel auf einen Flachbrett-Gelträger. Nach dem Auspolymerisieren können die Probenkämme entfernt und die Elektrophorese gestartet werden.

3.6.2. Probenvorbereitung

10 µl der Proben werden mit 3 µl 6-fach konzentriertem Farbmarker (2.5.4.) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Sucrosemarker bewirkt das Einsinken der DNA in die Probentaschen. Zusätzlich wandert der Farbmarker mit den Proben im elektrischen Feld, wobei anhand seiner zwei blauen Banden (Bromphenolblau und Xylencyanol) erkennbar ist, wie weit die DNA im Gel bereits gelaufen ist. Somit kann ein unkontrolliertes Auslaufen niedriger Banden (kleinerer Fragmente) aus dem Gel verhindert werden.

Die Gelelektrophorese wird bei 120 V ca. 30 min. durchgeführt.

Zur Auswertung wird das Gel unter einem UV-Schirm betrachtet.

3.7. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration wird bei 260 nm gemessen.

$$\frac{\text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times 40 \text{ (Faktor RNA)} \times \text{Verdünnung}}{1000} = \text{Konzentration mg/ml}$$

3.8. Bestimmung der RNA-Reinheit

Die Qualität der RNA lässt sich mit dem Auftrag eines Aliquots von 1 µl auf ein formaldehydhaltiges Agarose-Gel untersuchen. Mit dieser Methode lässt sich zeigen, ob die RNA bei der Präparation eventuell schon durch z.B. Scherkräfte oder RNasen zerstört wurde.

3.8.1. Formaldehydhaltiges RNA-Agarose-Gel

Mit dieser Methode erkennt man, ob die RNA während der Präparation degradiert ist, d. h. durch Scherkräfte oder RNasen zerstört wurde.

Bei einer guten Präparation beträgt das Verhältnis der nach der Auftrennung sichtbaren 28S rRNA zur 18S rRNA 2:1.

Durchführung:

1,8 g Agarose werden in 97,5 ml DEPC-Wasser suspendiert und aufgeköcht. Danach gibt man 12 ml 10 x MOPS-Puffer (2.5.12.), 9,9 ml 37%iges Formaldehyd und 0,5 µl Ethidiumbromid hinzu, vermischt dieses durch leichtes Schwenken und gießt das Gel in den vorbereiteten Gelträger.

Zur Probenvorbereitung gibt man zu 20 µg Gesamt-RNA das 3-fache Volumen an Ladungspuffer. Die Probe denaturiert man 5 min bei 60°C und stellt diese danach sofort auf Eis. Nach Zugabe des 0,9-fachen an Probenpuffer werden die Proben in die Geltaschen pipettiert und bei 120 V ca. 45 min aufgetrennt.

Zusätzlich bestimmt man das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Bei einer absolut reinen RNA beträgt das Verhältnis 2:1

Bei einem geringeren Verhältnis liegt eine Verunreinigung von Proteinen oder Phenol vor, die durch eine Phenolreinigung beseitigt werden kann.

3.9. Isolierung von DNA aus einem Agarose-Gel

Die Isolierung der nach einem präparativen Restriktionsverdau (3.5.2.) auf einem Agarosegel (5.6.) aufgetragene DNA für weitere molekularbiologische Methoden (z.B. Ligation) wurde mit dem Qiaquick Kit (Fa. Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Durchführung:

Die gesuchte(n) Bande(n) müssen unter dem UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Diesem wird das 3-fache Volumen an Puffer QG zugegeben und bei 55°C inkubiert. Dies geschieht solange,

bis die Agarose geschmolzen ist. Es folgt eine Zugabe von 1 Volumen 100% igem Isopropanol. Die Probe gibt man auf die QIAquick-Säule und zentrifugiert für 1 min bei 13000 rpm. Die Säule wird mit 500 µl Puffer QG gewaschen, wobei hierbei die restliche Agarose entfernt wird. Anschließend wird zentrifugiert. Eventuell vorhandene Salze werden mit 750 µl Puffer PE entfernt. Zur Elution der Probe aus der QIAquick Säule verwendet man 30-50 µl Aqua bidest und zentrifugiert erneut 13000 rpm 2 min. Danach folgt die Konzentrationsbestimmung im Photometer. Die gewonnene DNA kann nun für weitere Versuche eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden.

3.10. Ligation

Ligasen sind befähigt, einzelsträngige und auch doppelsträngige Nukleinsäurestücke zu verbinden.

Die „sticky-end“ Ligation beruht darauf, dass sich Vektor und zu klonierendes Insert über Wasserstoffbrücken der Basenpaarungen verbinden. Dadurch entsteht eine relativ stabile Struktur, auf die das Enzym, die T₄-Ligase, einwirken kann. Die T₄-Ligase verknüpft dabei das 5'-Phosphat-Ende des Vektors mit dem 3'OH-Ende des Inserts in Gegenwart von ATP.

„Sticky-end“ Ligationen werden bei 14-16°C, „blund-end“ Ligationen bei 12-14°C durchgeführt.

Durchführung:

Bei einer Ligation sollte Insert :Vektor im Verhältnis 3:1 stehen, wobei der Ligationsansatz 20 µl beträgt:

Insert : Vektor (3:1)

2 µl 10x Ligasepuffer

1 U T₄-Ligase

Mit sterilem Aqua bidest auf 20 µl ergänzen und den Ansatz 15 Stunden bei oben genannter Temperatur inkubieren.

3.11. Anlegen einer Glycerin-Dauerkultur

Eine Glycerinkultur ermöglicht die Konservierung der klonierten Plasmide in Zellen über mehrere Monate bei -80°C.

Durchführung:

In ein Eppendorfgefäß werden 750 µl der Über-Nacht-Kultur der zu konservierenden Transformanten gegeben und 150 µl autoklaviertes Glycerin hinzu pipettiert. Die Zellsuspension wird gut durchmischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.12. RNA-Isolation (n. Sacchi 1987)

Die Trennung von RNA, DNA und Proteinen erfolgt mittels saurer Guanidiniumcyanat-Phenol-Chloroform Methode nach Sacchi.

Danach wird die RNA mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol gefällt und anschließend mit Ethanol gereinigt.

Durchführung:

Die in einer 10 cm² Schale kultivierten Mesangiumzellen werden mit eiskaltem PBS-Puffer (2.7.) gewaschen und anschließend mit 400 µl saurem Guanidiniumthiocyanat versetzt. Die Zellen werden mit einem Gummischaber vom Boden der Petrischale abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 40 µl 2M Natriumacetat pH 4,0, 400 µl wassergesättigtem Phenol und 120 µl Chloroform, anschließend kräftigen Schütteln (15 sek) und 15 minütigem Stehenlassen auf Eis, folgt ein Zentrifugationsschritt bei 13000 g und 4°C für 15 Minuten. Es bilden sich drei Phasen aus. Die untere Phase (Phenolphase) enthält die DNA. In der Interphase sammeln sich die Proteine, während die obere wässrige Phase die RNA enthält. Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgt die Zugabe von 0,7 ml Isopropanol. Die RNA wird bei -20°C 16-24 Stunden gefällt. Danach werden die Proben für 15 Minuten bei 13000 g und 4°C zentrifugiert.

Das Isopropanol wird vorsichtig vom RNA Pellet entfernt. Mit Zufügen von 70%igem Ethanol und folgender Zentrifugation (s.o.) wäscht man die RNA zweimal. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird die RNA 5 Minuten bei 37°C getrocknet. Jetzt kann die RNA in sterilem, RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) aufgenommen werden. Zum vollständigen Lösen der RNA wird diese für 10 min bei 65°C erhitzt.

Es schließt sich die quantitative Überprüfung der Reinheit der gewonnenen RNA an (3.8.).

3.13. Northern-Blot Analyse

Die Northern-Blot Analyse ist ein kombiniertes Verfahren aus Gelelektrophorese, Blotting und Hybridisierung, das dem Nachweis einer bestimmten RNA-Sequenz dient.

Durchführung:

30 µg Gesamt-RNA werden mit gleichem Volumen Denaturierungspuffer versetzt und 15 min bei 65°C inkubiert. Zum Auftrag auf das denaturierende Agarosegel wird der Probe RNA-Ladepuffer zugesetzt. Die Auftrennung erfolgt bei 80 V für ca. vier Stunden.

Der Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran geschieht, indem man das Gel an seiner Unterseite mit einer Salzlösung in Kontakt bringt (SSC-Puffer (2.5.12.)) und auf die Oberseite zuerst die Membran, dann saugende Papiertücher legt. Diese wirken wie ein Schwamm, so dass die Salzlösung durch das Gel und die Membran strömt und dabei die im Gel befindliche RNA auf die Membran schwemmt. Dieser Vorgang wird über Nacht ausgeführt. Die RNA wird dann mittels UV Transilluminator (254 nm, 150 mJ) immobilisiert.

Zur Hybridisierung der Membran wird diese mit Puffer (2.5.12.) in einem Hybridisierungssofen für 3 Stunden bei 42°C inkubiert. Die DNA-Sonden werden mit dem „ready prime“ DNA labelling System von Amersham radioaktiv markiert. Dazu wird 25 ng DNA in 45 µl Wasser 5 min bei 95°C denaturiert und zu dem Reaktionsmix gegeben. Nach Zugabe von 5 µl [α -³²P] wird die Probe 60 min bei

37°C inkubiert, anschließend 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dann wird die Probe zur Membran gegeben. Über Nacht erfolgt bei 42°C die Hybridisierung. Die Membran wird zweimal mit 2x SSC/0,1% SDS (Waschpuffer 1) und zweimal mit 0,2x SSC/0,1%SDS (Waschpuffer 2) je 15 min gewaschen und anschließend autoradiographisch ausgewertet. Nach der Auswertung der Detektion der zu untersuchenden mRNA wird die radioaktiv gebundene cDNA durch Waschen der Membran in kochendem Waschpuffer 2 gelöst. Danach folgt die Hybridisierung mit radioaktiv markierter GAPDH cDNA Sonde, um eventuelle RNA Konzentrationsabweichungen auszuschließen.

3.14. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-Polymerase chain reaction)

3.14.1. Reverse Transkriptase (RT)

Die Reverse Transkription ist eine Methode, um RNA in DNA umzuschreiben. Die cDNA kann dann zur Vermehrung der Polymerasekettenreaktion zugeführt werden. Nach der RNA Isolierung inkubiert man diese mit einem Oligo dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisiert und dort als Startermolekül für die Reverse Transkriptase wirkt. Diese kann nun im Folgenden die mRNA als Matrize zur Synthese der cDNA nutzen. Das Produkt ist ein RNA-DNA-Hybrid.

Durchführung:

Die isolierte RNA wird 3 min bei 70°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

Folgende Komponenten werden zu der RNA pipettiert:

1	µl	Oligo dT-Primer (10 µg/µl)
1	µl	dNTP's (10 mM each)
2	µl	10x Reaktionspuffer
0,3	µl	RNasin
1	µl	Reverse Transkriptase
ad 20 µl mit sterilem Aqua bidest.		

Der Reaktionsansatz inkubiert erst 10 min bei Raumtemperatur und anschließend 60 min bei 37°C im Wasserbad. Zum Schluss erfolgt ein Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C.

Nach der Reversen Transkription kann der Ansatz zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion verwendet werden.

3.14.2. Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung eines beliebigen Abschnittes eines DNA-Moleküls. Zwei Oligonucleotid Primer kennzeichnen die Sequenzbereiche, die zu vervielfältigen sind. Die Primer hybridisieren bei einer Temperatur von 50-55°C (Die ideale Hybridisierungstemperatur liegt bei der Schmelztemperatur T_m des Hybrids aus Primer und Matrize. Sie lässt sich aus folgender Formel berechnen:

$$T_m = (4 \times [G+C]) + (2 \times [A+T]).$$

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei werden immer wieder (25-35 mal) drei Zyklen durchlaufen. In der Denaturierungsphase von 95°C lösen sich die Basenpaarungen; die Einzelstränge der DNA liegen vor. In der anschließenden Annealingphase lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNA. In der Synthesephase (72°C) wird die Matrize von der Taq-Polymerase abgeschrieben. Jede Phase dauert ca. 60 Sekunden (je nach Größe des zu amplifizierenden Abschnitts). Die Taq-Polymerase I stammt aus einem Bakterium, welches sich in heißen Quellen finden lässt (*Thermus aquaticus*). Es zeichnet sich gegenüber anderen Polymerasen durch seine Hitzestabilität aus.

Durchführung:

5	µl	10x Taq Polymerase-Puffer
5	µl	10x MgCl ₂ (25 mM)
20	pmol	Vorwärtsprimer
20	pmol	Rückwärtsprimer
1	µl	dNTP's (10 mM)
10	ng	DNA

ad 50 µl mit Aqua bidest.

Während des ersten Denaturierungsschrittes von 2 min wird zu jeder Probe 1 µl Taq-Polymerase (=4 U) pipettiert. Durch diesen Start („Hot-start“) erhöht sich Spezifität der Primerbindung. Die Proben durchlaufen dann die oben angeführten Zyklen. Bei jeder PCR-Reaktion sollte sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle mitgeführt werden, um die Spezifität der Primerbindung zu überprüfen. Bei der Positivkontrolle setzt man eine DNA ein, von welcher bekannt ist, dass sie das zu amplifizierende DNA-Fragment enthält. Als Negativkontrolle hingegen setzt man Aqua bidest anstelle der DNA ein. Nach dem Ende der PCR wird die wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Zur Kontrolle der PCR erfolgt ein Auftrag eines Aliquots von 10 µl auf einem Agarosegel. Die Identifizierung gelingt anhand eines Bandengrößenvergleichs mit einem aufgetragenen DNA-Größenmarker.

3.14.3. Semiquantitative PCR

Die semiquantitative PCR dient der relativen Quantifizierung von RNA, die so gering exprimiert ist, dass eine Untersuchung unter Anwendung des Northern-Blots nicht möglich ist. Die Quantifizierung mittels PCR gelingt, da über eine bestimmte Anzahl von Zyklen ein konstanter exponentieller Zusammenhang zwischen PCR-Produkt und Zyklenzahl besteht. So kann anhand der Menge des PCR-Produktes auf die Menge an eingesetzter RNA geschlossen werden.

Für die semiquantitative PCR wird zunächst die Zyklenzahl untersucht, bei der sich die Amplifikation im linearen Bereich befindet. Dazu werden verschiedene Verdünnungen durch Probenziehen nach unterschiedlichen Zyklenzahlen untersucht. Nach dem Auftrag dieser Proben auf ein Agarosegel kann man diejenige Zyklenzahl bestimmen, bei welcher sich die unterschiedlichen cDNA Konzentrationen optimal erkennen lassen. Um Pipettierfehler zu vermeiden, teilt man den PCR-Ansatz (Reaktionsgemisch + RT-Produkt ohne Primer und Polymerase) und führt die PCR parallel mit GAPDH-Primern durch.

3.14.4. Nested PCR

Durch die nested PCR kann die Produktspezifität der PCR deutlich gesteigert werden. Dabei wird eine erste PCR mit wenig stringenten Bedingungen (niedrige Annealing-Temperatur) durchgeführt, was zu erheblichen Mengen an unspezifischen Nebenprodukten führt. Im Anschluss daran wird eine zweite PCR mit den Produkten der ersten PCR als Matrizen-DNA durchgeführt. Dabei werden Primer verwendet, die jeweils intern von der Position der zuerst verwendeten Primer hybridisieren. So werden unspezifische Nebenprodukte der ersten PCR nicht mehr amplifiziert und die Temperatur kann entsprechend hoch angesetzt werden.

3.15. Sequenzierung nach Sanger et al.

Das Verfahren der DNA-Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem basenspezifischen Abbruch der von dem Enzym DNA-Polymerase katalysierten Reaktion aufgrund des Einbaus von Didesoxynukleotiden in den neu synthetisierten Strang [53]. Die DNA-Kettenverlängerung basiert auf einem Angriff der 3'OH-Gruppe der Desoxyribose am 3'-Ende des sich neu bildenden Stranges auf das Phosphoratom der α -Phosphatgruppe eines freien Desoxyribonukleosidtriphosphates. Das Fehlen dieser 3'OH-Gruppe führt nachfolgend zum Kettenabbruch. Die verwendeten Didesoxynukleotide sind fluoreszenzmarkiert, wobei jede Base ihre eigene Fluoreszenzmarkierung hat und so detektiert werden kann.

3.15.1. PCR-Reaktion

Zur Sequenzierung wird 250 ng DNA eingesetzt und mittels PCR analysiert.

Reaktionsansatz:

10 pmol Primer

2 µl BigDyeTerminator Premix

ad 10 µl mit Aqua bidest.

Denaturation: 96°C 10 sek

Anlagerung: 55°C 5 sek

Elongation: 60°C 4 min

Die Reaktion wird 35 mal wiederholt.

3.15.2. Sequenzierung im automatischen DNA Sequenzer ABI 310

Zur Aufarbeitung der Proben nach der PCR-Reaktion wird diesen 90 µl Aqua bidest, 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,6 und 250 µl 100% iges Ethanol zugeführt. Die Fällung und Pelletierung der DNA erfolgt bei 13000 rpm für 15 min. Danach wird die DNA mit 70% igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Das DNA-Pellet nimmt man 25 µl Templotsupressionreagenz auf, erhitzt 2 min bei 90°C und stellt die Reaktionsgefäße in den automatischen Sequenzierer ABI Prism 310.

3.16. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA ist eine Methode zur Ermittlung der bevorzugten Bindestellen von DNA-bindenden Proteinen. Das zu untersuchende Protein wird mit radioaktiv markierten, doppelsträngigen Oligonukleotiden definierter Länge und Basenzusammensetzung zur Reaktion gebracht. Nach Beendigung der Bindungsreaktion werden die gebildeten Protein/Oligonukleotid-Komplexe durch Gelelektrophorese von den nicht gebundenen Oligos getrennt.

3.16.1. Präparation der nuklearen Extrakten (modifiziert nach Dignam et al.)

Mesangiumzellen einer 10 cm² Petrischale werden mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS/EDTA (0,1 mM, mit) Puffer 5 min auf Eis inkubiert und von der Schale abgekratzt. Die Zellen werden bei 3000 rpm 5 min pelletiert und der Überstand gründlich entfernt. Zum Lösen des Pellets werden die Zellen in 300 µl Puffer A (3-faches Volumen) vorsichtig mit einer gelben Pipettenspitze auf und ab pipettiert und mindestens 20 min auf Eis inkubiert (2.5.9.). Die Zellyse kann mittels Glashomogenisator noch optimiert werden. Danach wird zentrifugiert und das nukleare Pellet in 50 µl eiskaltem Puffer B (2.5.9.) aufgenommen. Im Anschluss daran erfolgt eine tropfenweise Zugabe des gleichen Volumens an eiskaltem Puffer C (2.5.9.). Die Proben müssen nun bei 4°C 30 min in einem Schüttler vorsichtig (300 rpm) gemixt werden. Nach Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 30 min wird der Überstand abgenommen und über Nacht bei 4°C in Dialysepuffer dialysiert (2.5.9.). Am nächsten Morgen können die Proben bei 13000 rpm und 4 °C pelletiert, nach der Proteinkonzentrationsbestimmung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert werden.

3.17. DNase I-hypersensitive Stellen

DNase I-hypersensitive Stellen sind begrenzte Bereiche des aktiv transkribierten Chromatins, die besonders leicht von der Nuklease DNase I geschnitten werden. Diese Hypersensitivität beruht in der Regel auf der Bindung von Proteinen, Histonen, an die DNA. Die hypersensitiven Regionen repräsentieren häufig die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren. Bei dieser Methode wird an die DNA angelagertes Protein anhand seiner Fähigkeit nachgewiesen, die gebundene DNA-Sequenz gegen Einschnitte einer Endonuklease zu schützen.

3.17.1. Präparation von intakten Kernen aus Mesangiumzellen

Die kultivierten Mesangiumzellen werden mit PBS (2.7.) gewaschen, dann in 5 ml PBS abgeschabt und 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 4 ml Puffer 1 (2.5.10.) aufgenommen und mit dem Dounce homogenisiert. Nach Zugabe

von 8 ml Puffer 2 (2-faches Volumen) schichtet man die Suspension über ein aus Puffer 2 bestehendes Sucrosekissen (20 ml). Die Proben werden im SW 28 Rotor 45 min bei 4°C und 15000 rpm zentrifugiert. Das weiße Zellpellet enthält die Zellkerne. Das Pellet wird in 1 ml Storage-Puffer (2.5.10.) resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Die Proben können nun in 100 µl Aliquots à 1,5 Mio. Zellkernen bei – 80°C gelagert werden.

3.17.2. DNase I-Verdau

100 µl Zellsuspension und 100 µl Puffer D werden 2 min bei 30°C vorgewärmt und dann 5 min mit DNase I (0,5-10U) verdaut. Die Reaktion wird durch Zugabe von je 23 ml EDTA und EGTA gestoppt und 10 min bei 65°C inkubiert. Danach wird den Proben 1 ml DNAzol (+100 µg Proteinase K) zugefügt und diese über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Morgen wird 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit 0,5 ml 100%-igem Ethanol versetzt. Durch Schütteln der Eppendorfgefäße fällt die DNA aus. Die DNA wird 5 min bei 7000 rpm pelletiert, mit 70%-igem Ethanol gewaschen, in 100 µl Wasser aufgenommen und bei 65°C gelöst. 20-40 µg DNA schneidet man mit einem geeigneten Restriktionsenzym für 3-4 Stunden in einem Volumen von 200 µl und fällt die DNA danach in 660 µl 100%-igem Ethanol und 20 µl Natriumacetat pH 7,0. Nach der Zentrifugation wird das DNA-Pellet in 12 µl Wasser gelöst und auf ein 0,8%-igem Agarosegel aufgetragen und getrennt.

3.18. Transfektion

Transiente Transfektion von Mesangiumzellen wurde mittels Effectene transfection reagent (Qiagen) und Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System (Promega) durchgeführt.

Durchführung:

Einen Tag vor der Transfektion werden 400.000 Zellen pro Loch in eine Sixwell Platte pipettiert und in RPMI-Medium wachsen gelassen. Die Zellen sollten am Tag der Transfektion 40-80% konfluent sein.

Die Zellen werden mit PBS-Puffer gewaschen und mit 1,6 ml DMEM-Medium pro Loch überschichtet. Für die Transfektion werden pro Loch 0,4 µg kloniertes Luziferase-DNA-Konstrukt, 100 ng Renilla-DNA in ein Bluecap pipettiert und 100 µl EC-Puffer zugegeben. Anschließend pipettiert man 3,2 µl Enhancer zu, vortext kurz und lässt das Bluecap 5 min bei Raumtemperatur inkubieren. Nach Zugabe von 10 µl Effectene wird die Probe wieder 10 sek. gemischt und die Komplexbildung 5-10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach gibt man 600 µl DMEM-Medium (2.7.) hinzu, mischt vorsichtig mit der Pipette durch mehrmaliges Aufziehen und gibt 713 µl tropfenweise zu den Zellen. Danach werden die Zellen durch Schwenken nochmals gemischt und 18-24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wird das Medium abgenommen und durch neues DMEM-Medium ersetzt. Die Zellen werden je nach Bedarf mit den entsprechenden Substanzen stimuliert und erneut 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Für die Messung der Luziferase Aktivität werden die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen, in 100 µl Lysispuffer abgekratzt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. 50 µl Überstand wird in ein Sarstedt-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgt im AutoLumat mittels 100 µl Luziferase Assay Reagenz. Hierbei katalysiert die Luziferase eine bioluminescent Reaktion wenn sie mit dem Reagenz gemischt wird, die im Photometer gemessen werden kann. Anschließend wird diese Messung erneut mit dem Stop & Glo Reagenz, der einen Inhibitor der Luziferase und das Substrat für Renilla enthält, durchgeführt. Zur Auswertung wird die Luziferase Aktivität in Relation zu der Renilla Aktivität gesetzt.

Biochemische Methoden

3.19. Protein-Isolierung aus Mesangiumzellen

Mesangiumzellen einer 10 cm² Kulturplatte werden mit PBS-Puffer gewaschen und in 500 µl Lysispuffer abgekratzt. Die Zellen lysieren während der Inkubation auf Eis für 15 min. Die Zellextrakte werden 3 mal für 10 Sekunden sonifiziert und dann 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Proteinüberstand wird anschließend der Konzentrationsbestimmung mittels BIO-RAD-Proteinassay (3.19.1.) zugeführt.

3.19.1. Proteinbestimmung nach BIO-RAD-Assay

Durch Bindung von Proteinen in saurer Lösung an Coomassie Brilliant Blau verschiebt sich das Absorptionsmaximum dieser Substanz von 465 nm nach 578 nm. Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe erfolgt mit einer Eichkurve, die aus Proteinstandards erstellt wird.

Durchführung:

Für die Eichkurve werden aus einer Stocklösung von Rinderserumalbumin (100 mg/ 100 ml Aqua bidest) Standard-Konzentrationen von 2-80 µg/ml hergestellt: 800 µl der Standardlösung oder verdünnter Probe (10 µl Protein + 790 µl Aqua bidest) werden mit 200 µl Farbreagenz gut durchmischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgt bei 578 nm gegen einen Leerwert Aqua bidest + BIO-RAD-Reagenz im Beckmann-Photometer.

3.19.2. Fällung von Proteinen

Die benötigte Proteinmenge wird mit dem 3-fachen Volumen eiskaltem Aceton versetzt und zur Fällung über Nacht bei –20°C inkubiert. Danach wird das Protein bei 13000 rpm 15 min pelletiert.

3.20. Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Das SDS-Gel dient der Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen und Proteinmischungen. Diese Methode wird auch zur Reinigung von Proteinen herangezogen. Als Träger fungiert ein Polyacrylamidgel, dessen Porengröße durch Veränderung des Vernetzungsgrades so eingestellt wird, dass es eine optimale Auftrennung der Proteine erlaubt. Dem aufzutrennenden Proteingemisch wird Lämmli-Puffer zugegeben, welcher ein anionisches Detergenz, Sodium dodecyl sulfat (SDS), enthält. SDS ist ein Sulfatester des Dodekanols und bindet an die hydrophoben Bezirke des Proteins. Dies führt dazu, dass das Molekül in seine Untereinheiten dissoziiert. Ein weiterer Bestandteil des Lämmli-Puffers ist β-Mercaptoethanol, der die Disulfidbrücken spaltet und die Proteinkomplexe in ihre

Untereinheiten zerlegt. Die Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung (SDS) in Richtung der positiven Elektrode. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nach ihrem Molekulargewicht, da kleinere Proteine schneller durch die Poren des Polyacrylamidgels wandern. Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wird dem Trenngel noch ein Sammelgel vorgeschaltet, das die Proteine in einer scharfen Bande konzentriert.

Durchführung:

Das 10%ige Trenngel (2.5.6.) wird zwischen zwei Glasplatten gegossen. Damit beim ca. 30 minütigen Auspolymerisieren eine glatte Oberfläche entsteht, überschichtet man das Gel mit etwas Ethanol. Danach wird ein 5%iges Sammelgel (2.5.6.) auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Dieser wird bei der Auspolymerisation fixiert.

3.20.1. Auftragen der Proben auf das Gel

Die Proben werden mit gleichem Volumen Laemmli-Puffer (2.5.6.) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Glasplatten werden in die Elektrophoresekommer eingespannt und der Puffertank mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach dem Entfernen des Probenkamms werden die Probentaschen mit Puffer ausgespült und die Proben (50-100 µg Gesamtprotein) aufgetragen. Zur späteren Bestimmung der Molekulargewichte wird ein Molekulargewichtsmarker mit genau definierten Molekulargewichtsbanden aufgetragen.

3.20.2. Elektrophorese-Laufbedingungen

Die Elektrophorese wird mit 10-15 mA und max. 200 V ca. 16 Stunden über Nacht oder bei 50 mA ca. vier Stunden lang durchgeführt. Wenn die Bromphenolbande die untere Grenze des Gels erreicht, stoppt man die Elektrophorese.

3.20.3. Coomassie-Färbung

Mittels Coomassie-Färbung werden die aufgetrennten Proteine mit ihren Banden sichtbar gemacht. Der Vergleich mit dem aufgetragenen Molekulargewichtsmarker lässt die Größenbestimmung zu.

Durchführung:

Das Gel wird in einer 0,05 %igen Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbelösung (2.5.6.) 60 min unter Schütteln gefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Anschließend folgt die völlige Entfärbung des Hintergrundes unter erneutem Schütteln in einer Entfärbelösung (2.5.6.).

3.21. Immunoblotting unter Verwendung der Western-Blot-Technik

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine inerte Membran gelingt mittels Western-Blot. Dies ermöglicht die freie Zugänglichkeit der Proteine zum Nachweis mit einem spezifischen Antikörper.

Durchführung:

Nach der SDS-Elektrophorese können die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Der Transfer geschieht unter Strom, wobei die Proteine in Richtung Anode wandern.

3.21.1. Ponceau-Färbung

Nach dem Proteintransfer wird die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt, um die Eichproteine zu kennzeichnen und um den Blot, je nach späterer Handhabung, in einzelne Banden zu zerschneiden. Auch ermöglicht die Färbung eine Beurteilung der Transfereffizienz.

Durchführung:

Die Nitrozellulosemembran wird etwa 5 min in einer Lösung aus 0,2% Ponceau S in 3% Sulfosalicylsäure und 0,1% Essigsäure unter leichtem Schwenken gefärbt. Anschließend wird die Membran mit Wasser bis zur Entfärbung des Hintergrundes entfärbt. Danach wird die restliche Ponceau S Farblösung ausgewaschen. Das Gel wird nach dem Blotten in einer Coomassie-Lösung gefärbt, um die Effizienz des Transfers zu beurteilen.

3.21.2. Immunologischer Nachweis des Proteins

Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgt mit 2% BSA in TBST (2.5.7.), einem Detergenz für zwei Stunden. Danach folgt die Inkubation des Blots mit einem spezifischen primären Antikörper über Nacht, welcher zuvor in TBST verdünnt wurde. Danach wird der Blot zweimal kurz gespült, 15 min geschüttelt und nochmals zweimal kurz mit jeweils TBST gewaschen, so dass nur gebundener Antikörper vorhanden bleibt. Durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper (verdünnt in 2% BSA/TBST für 60 min unter Schütteln), der an den primären Antikörper bindet und an ein Enzym gekoppelt ist, wird anschließend detektiert. Es folgt ein wie oben beschriebener Waschschrift und die Zugabe eines Farbsubstrates zu Detektion. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym setzt das zugegebene Farbsubstrat um. So entsteht dort, wo der spezifische, primäre Antikörper an das Protein gebunden hat, eine gefärbte Bande. Durch den Vergleich mit einem Eichprotein (Marker) gelingt die Größenidentifizierung (2.5.6.).

3.21.3. Nachweis mittels ECL

Bei diesem System handelt es sich um ein lichtemittierendes, nicht radioaktives Nachweissystem. Der Vorteil liegt in der sehr hohen Nachweisempfindlichkeit. Es lassen sich noch Antigenmengen von <1pg detektieren, was auf der Gegenwart von Enhancern beruht (ECL-System der Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Das Prinzip dieses Chemilumineszens-Detektionsystems beruht darauf, dass die Peroxidase die Oxidation des Luminols katalysiert und dadurch eine Lichtemission entsteht, die sich mittels eines Röntgenfilms detektieren lässt. Auf dem Film entsteht an der Stelle, an dem der Antikörper gebunden hat, eine Schwärzung.

Durchführung:

Detektionslösung 1 und 2 werden zu gleichen Teilen gemischt, auf die Nitrozellulosemembran gegeben und genau 1 min inkubiert. Die Membran wird auf Whatman-Papier getrocknet, in Folie verpackt und auf einen Film (Kodak X-omat) aufgelegt. Danach folgt die Entwicklung des Films.

Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten glomerulären Mesangiumzellen wurden von Prof. J. Pfeilschifter isoliert [102]. Die Zellen werden in RPMI 1640 Medium, das mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamat, 5 ng/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt ist, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden nur Zellen der Passagen 12-23 verwendet.

3.22. Passagieren der Zellen

Vor dem Passagieren der Zellen, werden diese mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml Trypsin/EDTA auf eine 175 cm² Kulturflasche werden die Zellen 2-5 min bei 37°C inkubiert, wobei der Vorgang der Zellablösung mittels eines Mikroskops kontrolliert wird. Anschließend gibt man 10 ml RPMI-Medium in die Flasche, überführt die Zellsuspension in ein Falcon-Tube und zentrifugiert die Zellen bei 1100 rpm ca. 5 min ab. Die Zellen werden in der geeigneten Menge RPMI-Medium aufgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

3.23. Hungern der Zellen

Je nach Untersuchungsziel werden die Mesangiumzellen vor der Stimulation 24 Stunden einem serumfreien Hungermedium, das mit 0,1 mg/ml fettsäurefreiem BSA versetzte wurde, inkubiert.

3.24. Nitrit-Analyse

Nitrit (NO₂⁻) wird mittels der Griess-Methode im Zellkultur Überstand gemessen. 100 µl des jeweiligen Zellkultur-Überstandes werden mit 100 µl „ready to use“ Griess-Reagenz versetzt. Die Messung erfolgt in einem Microplate Reader bei 540 nm.

4. Ergebnisse

Die nachfolgenden Ergebnisse sind repräsentativ entsprechende Ergebnisse wurden in jeweils 3 unabhängigen Versuchen gewonnen.

4.1. Nachweis der CPT 1 mRNA aus dem Genom von Ratten-Mesangiumzellen

Zum Nachweis der CPT 1 mRNA in Ratten-Mesangiumzellen wurde aus diesen Gesamt-RNA isoliert und anschließend der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion zugeführt. Die verwendeten Forward- und Backprimer (fcpt1+bcpt1) sind sequenzspezifisch für CPT1 und wurden so gewählt, dass bei Vorhandensein der CPT 1 mRNA ein 366 bp Fragment entstehen konnte.

Als Negativkontrolle wurde anstelle von DNA Wasser eingesetzt, als Positivkontrolle hingegen ein mRNA aus HepG2 Zellen, einer Leberzelllinie, von welcher bekannt ist, dass sie die CPT 1 mRNA enthält.

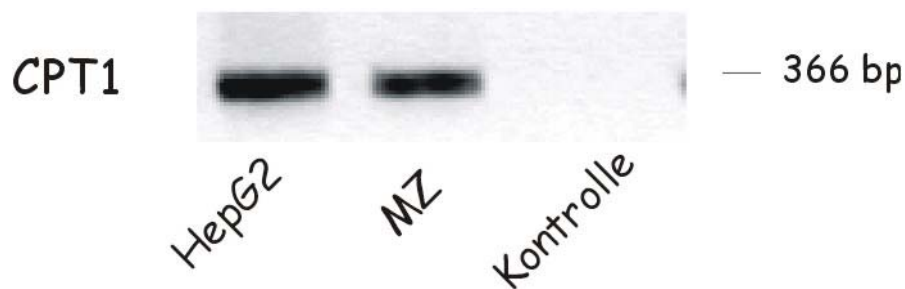


Abb. 3: Nachweis der CPT 1 mRNA im Genom von Ratten-Mesangiumzellen mittels RT-PCR

5 µg mRNA aus Ratten-Mesangiumzellen wurden für die RT-PCR eingesetzt. Als Primer diente ein OligodT Primer für die Reverse Transkription und spezifische Primer fcpt1 (1899-1879: 5'-ATGGCAGAGGCTCACCAAGCTGTGGCC-3') + bcpt1 (1167-1188: 5'-ATGGTCATGATGAC TGCCACCCAGAG-3') für die PCR. Postivkontrolle war mRNA aus HepG2 Zellen, als Negativkontrolle wurde Wasser eingesetzt. Die PCR wurde mit 35 Zyklen bei 95°C Denaturierung, 52°C Annealing und 72°C Synthese für jeweils 1 min durchgeführt.

4.2. Immunologischer Nachweis des CPT 1 Proteins in Ratten-Mesangiumzellen

Zum Nachweis des CPT 1 Proteins wurden Mesangiumzellen für 24 Stunden in RPMI-Medium mit Insulin (5 ng/ml) stimuliert und die Proteinfraction isoliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE (3.20.) folgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (3.21.), um mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen CPT 1 das Protein nachzuweisen (3.21.2.). Die Detektion wurde mit dem ECL-System durchgeführt (3.21.3.).

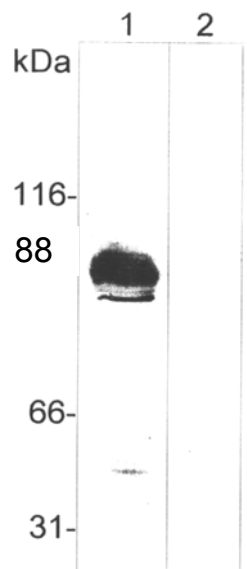


Abb. 4: Nachweis des CPT 1 Proteins in Ratten-Mesangiumzellen mittels Western-Blot

Es wurden pro Spur 80 µg der Proteinfraction von Ratten-Mesangiumzellen aufgetragen, auf einem 12 %igem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran elektrotransferiert.

Primärer Antikörper: Anti-CPT 1-Serum (1:400).

Spur 1: Anti-CPT 1 ; Spur 2: Präimmunserum

Sekundärer Antikörper: Anti-rabbit-IgG-PO (1:10000).

Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System.

Es kann eine Bande in Größe von 87-89 kDa detektiert werden.

4.3. Charakterisierung der CPT 1 mRNA Expression nach Stimulation mit IL-1 β

In den folgenden Untersuchungen wurden die Mesangiumzellen in RPMI-Medium kultiviert und bei 70-80%iger Konfluenz für 24 Stunden in DMEM-Medium gehungert. Anschließend wurden die Zellen mit Interleukin 1 β stimuliert und die RNA isoliert.

4.3.1. Interleukin 1 β Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Interleukin 1 β Konzentration zur Stimulierung der CPT 1 Expression wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Zytokins stimuliert.

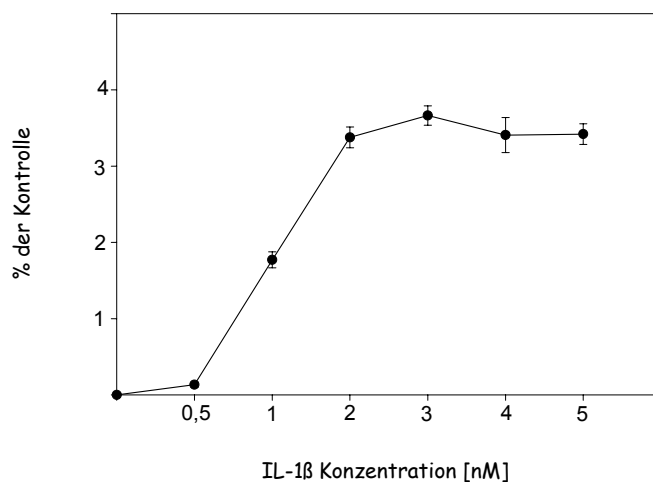
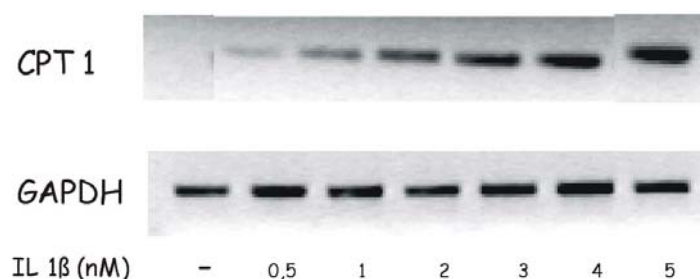


Abb. 5: CPT 1 Expression als Funktion der Interleukinkonzentration

Die Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen IL-1 β stimuliert. Danach wurde Gesamt-RNA isoliert und die CPT 1 Expression mittels PCR untersucht. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, n = 3 aufgetragen



Die maximale Stimulationskonzentration liegt bei 3 nM.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit einer suboptimalen IL-1 β Konzentration von 1 nM und einer Stimulationsdauer von 24 Stunden durchgeführt.

4.3.2. Inkubationszeit

Zur Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer der CPT 1 Expression wurde Gesamt RNA als Funktion der Inkubationszeit ermittelt.

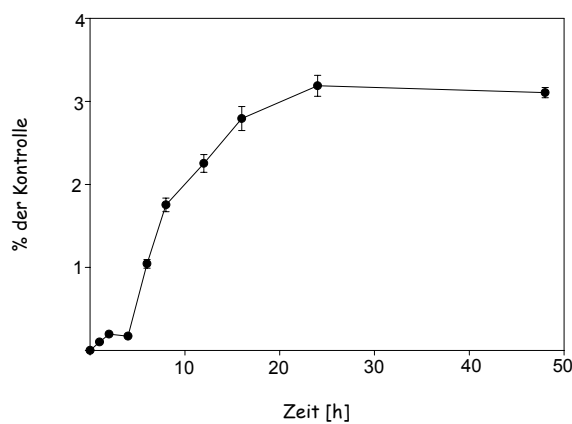
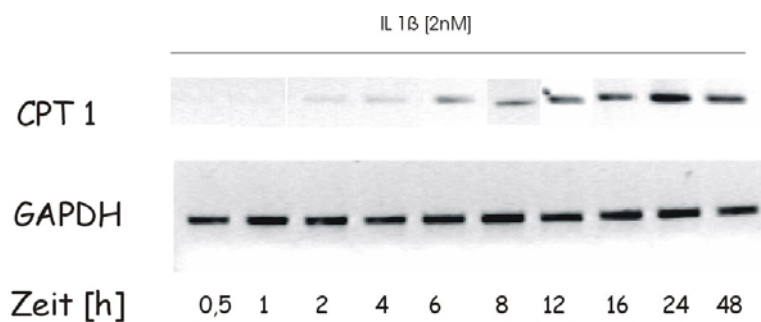


Abb. 6: Expression der CPT 1 mRNA nach Stimulation von unterschiedlicher Dauer mit IL-1 β .

Die Zellen wurden mit 2nM Interleukin 1 β stimuliert und die RNA nach unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM, n = 3 aufgetragen.



Im Ergebnis zeigt sich ein CPT 1 mRNA Anstieg nach 2 Stunden, der nach 24 Stunden sein Maximum erreicht und bis 48 Stunden kontinuierlich anhält.

Die nachfolgenden Versuche wurden mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt.

4.4. Einfluss von Palmitat und Carnitin auf die Zytokin-induzierte CPT 1 mRNA Expression

Zur Untersuchung der Expression der CPT 1 mRNA in entzündlichen Stoffwechselsituationen nach Stimulation mit Palmitat, dem physiologischen Substrat der CPT 1 wurden die Mesangiumzellen 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen Palmitat inkubiert. Das lipophile Palmitat wurde hierzu in DMSO gelöst. Das Lösungsmittel DMSO selbst hat auf die CPT 1 Expression keine stimulatorische oder inhibierende Wirkung.

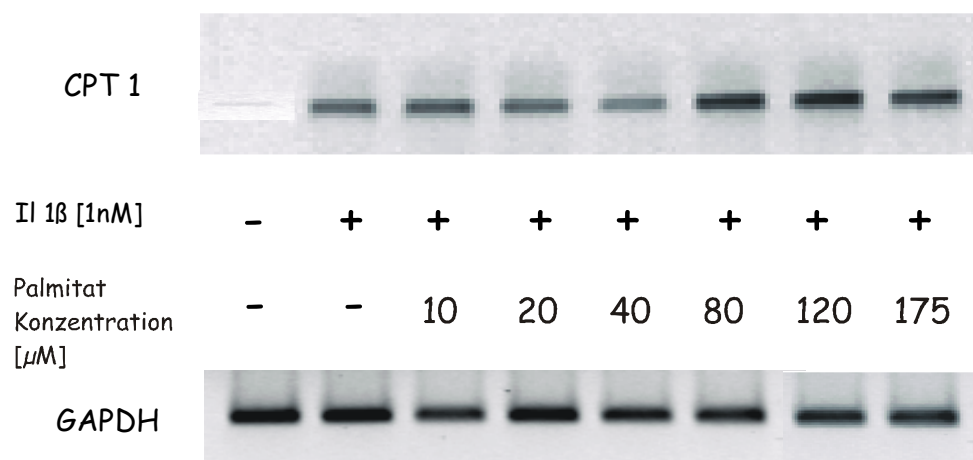


Abb. 7: Einfluss des physiologischen Substrats Palmitat auf die Expression der CPT 1

Die Mesangiumzellen wurden mit 1 nM Interleukin 1 β und steigenden Konzentrationen Palmitat gelöst in DMSO stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern für die CPT 1 durchgeführt.

Die CPT 1 mRNA Expression wird durch Palmitat unter Einwirkung von IL-1 β stimuliert. Das Stimulationsmaximum liegt zwischen 80 und 120 μ M (1,8 fach im Vergleich zur IL-1 β Stimulation). Die nachfolgenden Untersuchungen wurden mit einer Palmitatkonzentration von 80 μ M durchgeführt.

Palmitat wird durch die Carnitin Palmitoyltransferase im Stoffwechsel aus dem Cytosol in das Innere des Mitochondriums transportiert. Bei diesem Vorgang wird Palmitat mit Carnitin verestert und so durch die Mitochondriummembran transportiert.

Zur Untersuchung des Einflusses von Carnitin auf die CPT 1 Expression wurden die Zellen mit IL-1 β [1 nM], Palmitat [80 μ M] und steigenden Konzentrationen Carnitin stimuliert.

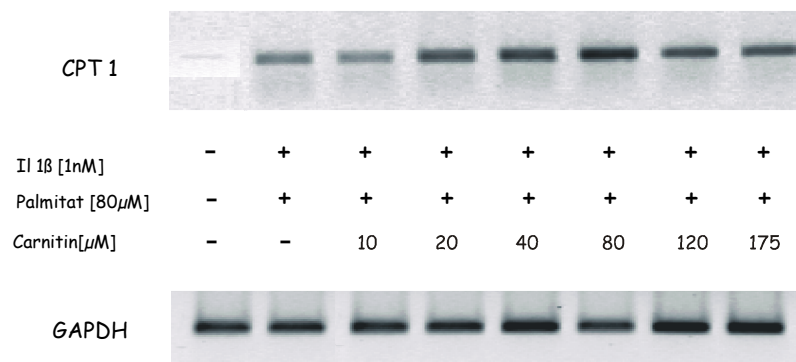


Abb. 8: Einfluss von Carnitin auf die CPT 1 Expression

Die konfluenten Mesangiumzellen wurden mit 1 nM Interleukin 1 β , 80 μ M Palmitat und steigenden Konzentrationen Carnitin für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde Gesamt-RNA isoliert und eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Zur Kontrolle wurde eine PCR mit GAPDH Primern mitgeführt.

Carnitin steigert die Zytokin und Palmitat-induzierte Expression der CPT 1 mRNA konzentrationsabhängig mit einem maximal stimulierenden Effekt bei einer Konzentration von 80 μ M (1,5 fach). Carnitin alleine hat keinerlei Effekt auf die CPT 1 mRNA Expression (Daten nicht gezeigt).

4.5. Wirkung von Carnitin und Palmitat auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 Protein-Expression

Zum Nachweis des CPT 1 Proteins wurden konfluente Zellen mit IL-1 β , Palmitat und Carnitin stimuliert und nach 24 Stunden die Proteinfraction isoliert. Das Protein wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt und nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einem anti-CPT 1 Antikörper inkubiert.

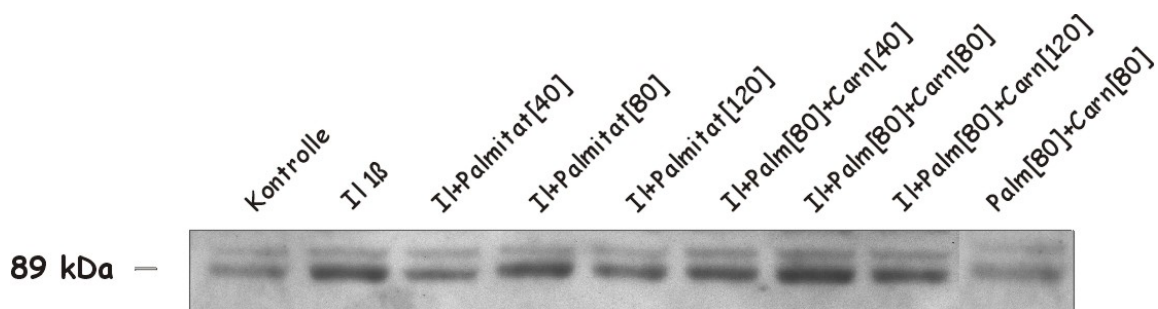


Abb. 9: Regulation des CPT 1 Proteins in Ratten-Mesangiumzellen

Die konfluenten Mesangiumzellen wurden mit 1 nM Interleukin 1 β , Palmitat und Carnitin 24 Stunden stimuliert. Danach wurde Protein isoliert und 80 μ g auf einem 12 %igem SDS-PAGE aufgetrennt. Die Immunreaktion wurde mit einem anti-CPT1 N-terminalen Antikörper (1:500) und einem sekundären Antikörper (anti-rabbit-IgG-PO) durchgeführt. Die Blots wurden mittels ECL-System entwickelt.

Die Proteinbanden repräsentieren das CPT 1 Protein mit einer Größe von 87-89 kDa. Die Stimulation der CPT 1 Protein Expression durch Palmitat ist nicht erkennbar. Nach Stimulation der Ratten-Mesangiumzellen mit IL-1 β + Palmitat und Carnitin ist eine geringe Steigerung der CPT1 Expression erkennbar.

4.6. Einfluss von verschiedenen Substraten auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 mRNA Expression

Zur Untersuchung der Affinität von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und Sättigung wurden kultivierte Mesangiumzellen mit Docosahexaensäure (DHA, 22:6 ω -3), α -Linolensäure (18:3 ω -3) und γ -Linolensäure (C18:3 ω 6) stimuliert.

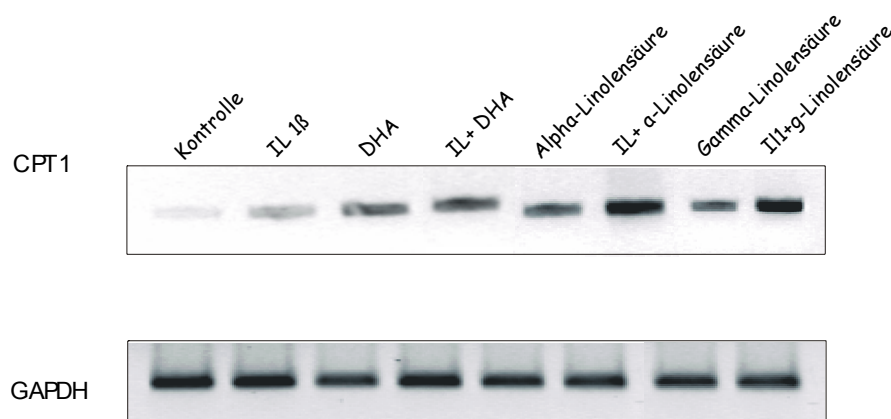


Abb. 10: Expression der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Fettsäuren

Konfluente Mesangiumzellen wurden mit Docosahexaensäure, α -Linolensäure und γ -Linolensäuren in einer Konzentration von 80 μ M in An- bzw Abwesenheit von 1nM Interleukin 1 β stimuliert. RNA wurde isoliert und die CPT 1-Expression mittels RT-PCR bestimmt.

Es zeigt sich eine leichte Induktion der Expression von CPT 1 bei allen drei Fettsäuren. Eine Steigerung der Expression in Anwesenheit von IL-1 β kann nur für α -Linolen- und γ -Linolensäure gezeigt werden. Die mittelkettige Fettsäure Oktanoat hat keinen regulatorischen Einfluss auf die CPT 1.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jauch an der Universität Regensburg konnte ich den Einfluss von Lipopolysaccharid (LPS) auf die Regulation der CPT 1 untersuchen.

In Stoffwechselsituationen mit erhöhtem Energiebedarf oder mangelnder Energiezufuhr wie Diabetes, Hunger und Infektionen reagiert der Organismus mit

einer Steigerung der Transkriptionsrate der Carnitin-Palmitoyltransferase, um so eine ausreichende Energieversorgung zu gewährleisten. Der Endotoxinschock hingegen ist gekennzeichnet durch eine Inhibition der Ketogenese. Zur Untersuchung dieses Phänomens auf RNA Ebene wurden Ratten mit LPS behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet.

Danach wurde diesen die Leber entnommen. Nach RNA-Isolation wurde die Expression der CPT 1 mittels Northern-Blot Analyse untersucht.

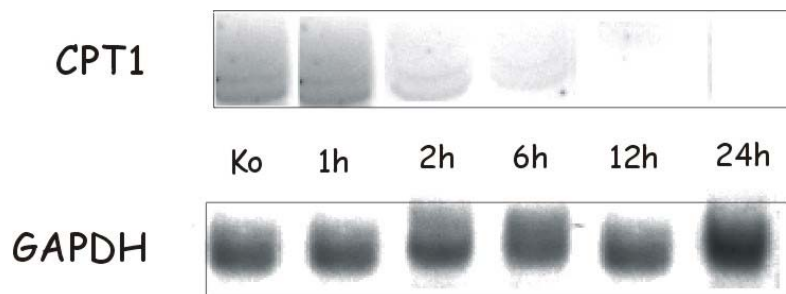


Abb. 11: Effekt von LPS auf die Regulation der CPT 1 in Rattenlebern

Den Ratten wurde LPS injiziert, daraufhin wurden sie nach unterschiedlichen Zeitpunkten getötet und die Leber entnommen. Nach der Gesamt-RNA Isolation wurden 30 µg RNA für die Northern-Blot Analyse verwendet. Die Membran wurde mit einem radioaktivmarkierten CPT 1-cDNA Fragment hybridisiert und mittels eines automatischen Detektorsystems sichtbar gemacht. Als Ladungskontrolle wurde derselbe Blot mit einer ebenfalls radioaktivmarkierten GAPDH-cDNA Probe hybridisiert.

Die Northern-Blot Analyse zeigt eine drastische Abnahme der CPT 1 mRNA Expression bereits nach zwei Stunden.

4.7. Einfluss von NO auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 mRNA Expression

Zur Untersuchung des Einflusses von NO auf die Expression der CPT 1 wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des NO-Donors Deta-NO in An- bzw. Abwesenheit von Interleukin 1 β stimuliert. Darüber hinaus wurden die Zellen mit

L-N^G-Monomethyl-Arginin (L-NMMA), einem potenten Inhibitor aller NO-Synthasen, stimuliert.

4.7.1. Deta-NO Konzentrationsabhängigkeit



Abb. 12: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen

Konfluente Mesangiumzellen wurden mit steigenden Konzentrationen Deta NO 24 Stunden in DMEM-Medium stimuliert. Dabei wurden diese Versuche mit Deta NO alleine und in Kombination mit 1 nM IL-1β durchgeführt. Anschließend wurde Total RNA isoliert und nach der Reversen-Transkription eine PCR mit spezifischen Primern für CPT 1 durchgeführt. Als Kontrolle diente eine PCR mit GAPDH Primern.

Deta-NO zeigt einen expressionserhöhenden Effekt auf CPT 1. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und sein Maximum ist bei 500 µM erreicht (5,3 fach im Vergleich zur Kontrolle). Stimuliert man die Zellen mit Deta NO und gibt gleichzeitig 1 nM Interleukin 1β, zeigt sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der gesteigerten CPT 1 Expression. Bei einer Gabe von IL-1β in Kombination mit L-N^G-Monomethyl-Arginin (L-NMMA), einem spezifischen Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase, kann eine erhöhte Expression der CPT 1 gegenüber Interleukin 1β Stimulation alleine beobachten werden.

4.7.2. Deta-NO Zeitkinetik

Um die Wirkung von Deta NO in Abhängigkeit von der Zeit zu untersuchen wurden die Zellen mit 500 μ M Deta NO alleine oder kombiniert mit 1 nM Interleukin 1 β stimuliert.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte dann die RNA isoliert und analysiert werden.

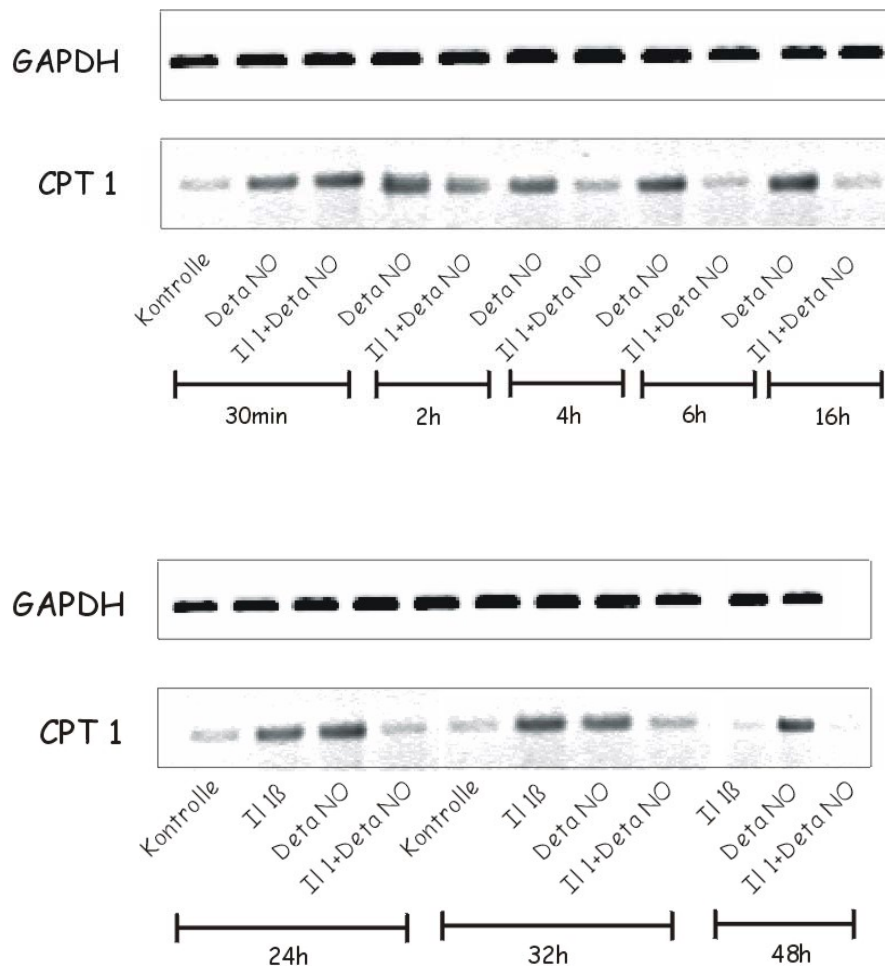


Abb. 13: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen in Abhängigkeit von der Zeit

Konfluente Mesangiumzellen wurden mit 500 μ M Deta NO in DMEM-Medium stimuliert. Dabei wurden diese Versuche mit Deta NO alleine und in Kombination mit 1 nM IL-1 β durchgeführt. Anschließend wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten die totale RNA isoliert und nach der Reversen-Transkription eine PCR mit spezifischen Primern für CPT 1 gemacht. Als Kontrolle diente eine PCR mit GAPDH Primern. Zur Auswertung des Versuches wurde die PCR auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Die PCR Auswertung zeigt, dass Deta NO alleine bereits nach 30 min einen stimulierenden Effekt auf die CPT 1 mRNA aufweist, der sich mit verlängerter Zeiteinwirkung noch deutlich steigert. Deta NO in Kombination mit Interleukin 1 β führt zunächst nach 30 min zu einer Expressionssteigerung der CPT 1 und minimiert dann mit verlängerter Einwirkungszeit die CPT 1 Expression bis auf das Kontrollniveau. Den Beginn dieses Effektes sieht man bereits nach 2 Stunden.

4.8. Einfluss von NO auf die Zytokin-induzierte CPT 1 Protein Expression

Mesangiumzellen wurden stimuliert entsprechend den RNA Daten mit Interleukin-1 β (1nM), Deta-NO (250 μ M) und 3mM L-N^G-Monomethyl-Arginin (L-NMMA) für 24 Stunden stimuliert und anschließend wurde Gesamt-Protein Extrakt isoliert. Die Detektion gelang mit einem spezifischen Antikörper gegen CPT 1

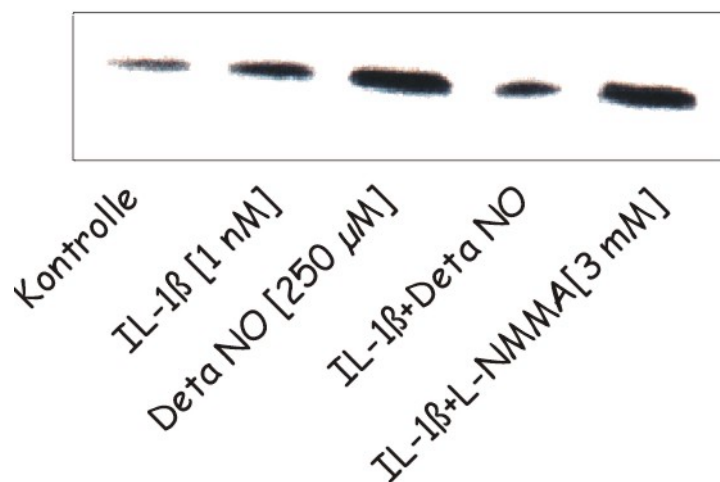


Abb. 14: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 Protein Expression in Ratten-Mesangiumzellen

Ratten-Mesangiumzellen wurden 24 Stunden mit 1nM IL-1 β , 250 μ M Deta-NO, 1nM IL-1 β + 250 μ M Deta-NO und 1nM IL-1 β + 3 mM L-NMMA inkubiert. Anschließend wurde Gesamt-Protein isoliert und 50 μ g Protein-Extrakt auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Die Detektion gelang mit einem spezifischen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen CPT 1.

4.9. Regulation der CPT 1 mRNA Expression im hämorrhagischen Schock

In der Arbeitsgruppe von Prof. Pfeilschifter war es mir möglich, die Wirkung der CPT 1 Regulation im Rattenmodell des hämorrhagischen Schocks zu untersuchen. Mit diesem Versuche sollte die in vivo Relevanz der CPT 1 Regulation durch NO überprüft werden. Der hämorrhagische Schock ist gekennzeichnet durch akute Vasodilatation, Blutdruckabfall und einer massiven Freisetzung von NO. Die verwendeten Substanzen L-NIL und 1400W sind selektive Inhibitoren der induzierbaren NO-Synthase. Die verwendeten RNA Proben wurden in Tierversuchen der Arbeitsgruppe von C. Thiernemann (London) durchgeführt [105].

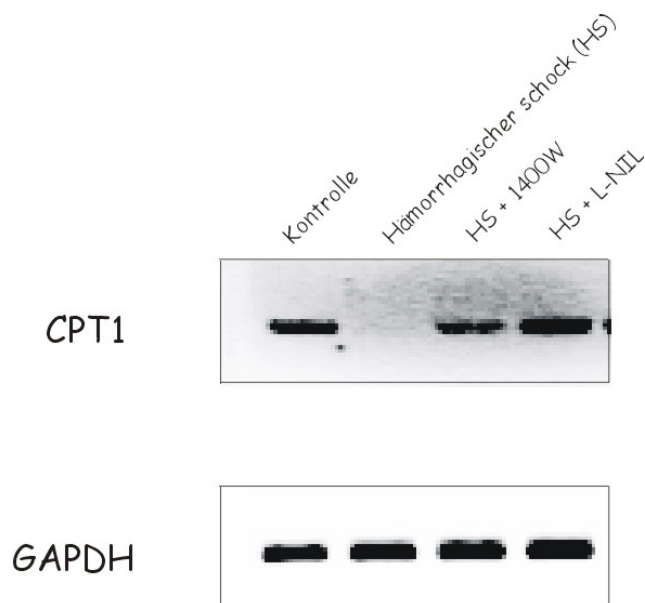


Abb. 15: Regulation der CPT 1 im hämorrhagischen Schock

Aus den Ratten-Nieren wurde Gesamt-RNA isoliert. Nach der Reversen-Transkription wurde eine PCR mit spezifischen Primern für CPT 1 durchgeführt. Als Kontrolle diente eine PCR mit GAPDH Primern. Zur Auswertung des Versuches wurde die PCR auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Die CPT 1 wird im hämorrhagischen Schock signifikant reprimiert. Nach Gabe eines iNOS Inhibitors (1400W bzw. L-NIL) kann diese Herunterregulation wieder aufgehoben werden.

4.10. Klonierung des CPT 1 Promotors

Zum weiteren Verständnis der regulatorischen Wirkung der untersuchten Substanzen auf die CPT 1 Expression war es notwendig, den CPT 1 Promotor zu klonieren. Bei der Durchsicht der regulatorischen Elemente im schon bekannten CPT 1 Promotor [46] fand ich ein PPAR-Consensus-Bindungselement, über das sich die diesbezügliche Wirkung der Fettsäuren erklären lassen könnte.

Die Primer wurden so gewählt, dass ein 4235 bp großes Fragment entstand, welches das PPAR-Consensus Element (2941-2952) enthält. Dazu wurde die Methode der nested-PCR verwendet. In einem ersten PCR Schritt wurde isolierte genomische DNA mit CPT disextern und CPT extern durchgeführt. Die Annealing Temperatur lag bei 52°C. In einem zweiten Schritt wurde eine PCR mit den CPT internen und CPT disinternen Primern gefahren und als Template 1 µl der ersten PCR-Runde eingesetzt. Diese PCR wurde nun unter hoch stringenten Bedingungen bei 68 °C durchgeführt.

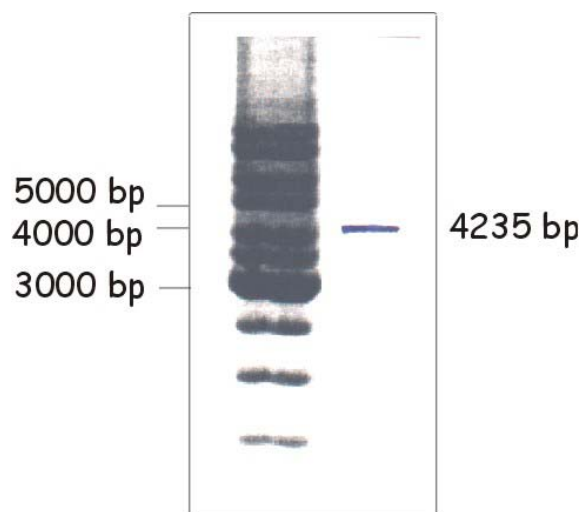


Abb. 16: Klonierung des CPT 1 Promotors aus genomischer DNA

Für die PCR wurde ein inneres und ein äußeres Primerpaar gewählt. Für die PCR wurden folgende Zyklen verwendet:

Äußeres Primerpaar: 94°C 30 sek, 53°C 1 min, 72°C 4 min

Inneres Primerpaar: 94°C 30 sek, 68°C 1 min, 72°C 4min

Für die zweite PCR-Runde wurde 1 µl PCR-Ansatz der ersten PCR-Runde als DNA-Template eingesetzt.

Die amplifizierte 4235 kb große Bande konnte nach Sequenzierung als CPT 1 Promotor identifiziert werden.

4.11. Einfluss des PPAR- α Agonisten Wy 14643 auf die CPT 1 mRNA Expression

Zur Untersuchung, ob der PPAR α Agonist Wy 14643 einen Einfluss auf die CPT 1 mRNA Regulation hat, wurden Ratten-Mesangiumzellen mit Wy in Kombination mit IL-1 β stimuliert.

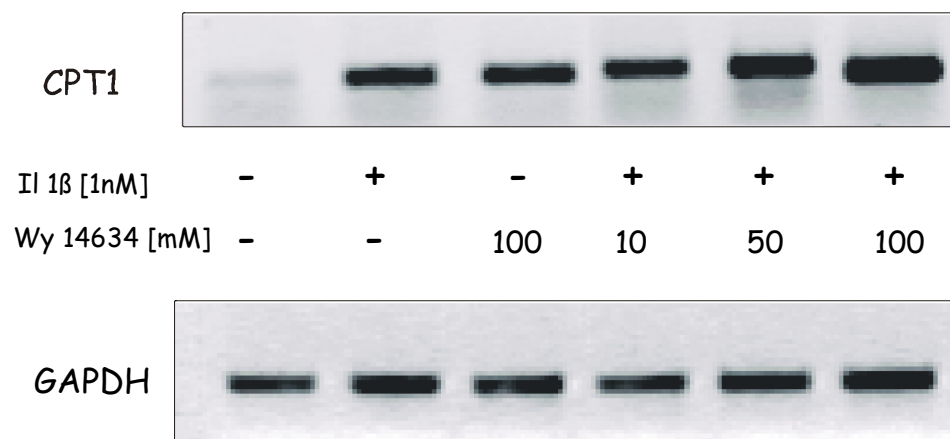


Abb. 17: Wirkung von Wy 14643 auf die CPT-1 Expression in Ratten-Mesangiumzellen
Konfluente Mesangiumzellen wurden 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen Wy 14643 und IL-1 β stimuliert. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels semiquantitativer PCR analysiert.

Nach Stimulation mit Wy 14643 kann eine Steigerung der Zytokin induzierten mRNA Expression von CPT 1 gezeigt werden (1,9 fach).

4.12. Regulation der induzierbaren NO-Synthase

Zur Identifizierung der möglichen regulatorischen DNA Elemente der iNOS Expression wurde ein 4,5 kb langes Fragment upstream des Transkriptionsstarts des iNOS Gens kloniert. Aus vorangegangenen Experimenten war die Hypothese formuliert worden, dass die Zytokin stimulierte iNOS Transkription über C/EBP und NF- κ B reguliert wird und mittels anderer inflammatorischer Mediatoren verstärkt und verlängert wird. Zum Verständnis der lang anhaltenden Wirkung der Zytokine auf die transkriptionelle Regulation der induzierbaren NO-Synthase wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

4.12.1. Analyse der DNase I hypersensitiven Sites der 5' Region des iNOS Gens

DNase I-hypersensitive Stellen sind begrenzte Bereiche des aktiv transkribierten Chromatins, die besonders leicht von der Nuklease DNase I geschnitten werden. Diese Hypersensitivität beruht in der Regel auf der Bindung von Proteinen, Histonen, an die DNA. Die hypersensitiven Regionen repräsentieren häufig die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren. An die DNA angelagertes Protein wird anhand seiner Fähigkeit nachgewiesen, die gebundenen DNA-Sequenz gegen Einschnitte einer Endonuklease zu schützen.

Zur Untersuchung der Änderung der Chromatinstruktur nach Zytokinstimulation wurden 5×10^7 Mesangiumzellen in einer 10 cm^2 Zellkulturschale kultiviert. Für jede Stimulationsuntersuchung wurden 10 Kulturschalen verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zytokinmix (2nM IL- 1β + 2nM TNF- α 1 für 24 Stunden stimuliert. Nach der Zellkernextraktion wurden diese mit DNase I (Konzentration 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 U/ml) verdaut und anschließend die genomische DNA isoliert. Nach der Behandlung mit PstI wurde die DNA auf einem 0,7 %igen Agarosegel getrennt und mittels Southern-Blot analysiert. Die DNA enthaltende Membran konnte dann mit einer radioaktiv-markierten Probe der iNOS 5'-flankierenden Region (1500 bp PstI/BglII Fragment, welches das Intron1, das benachbarte Exon und Sequenzen der Promotorregion umspannt) hybridisiert werden.

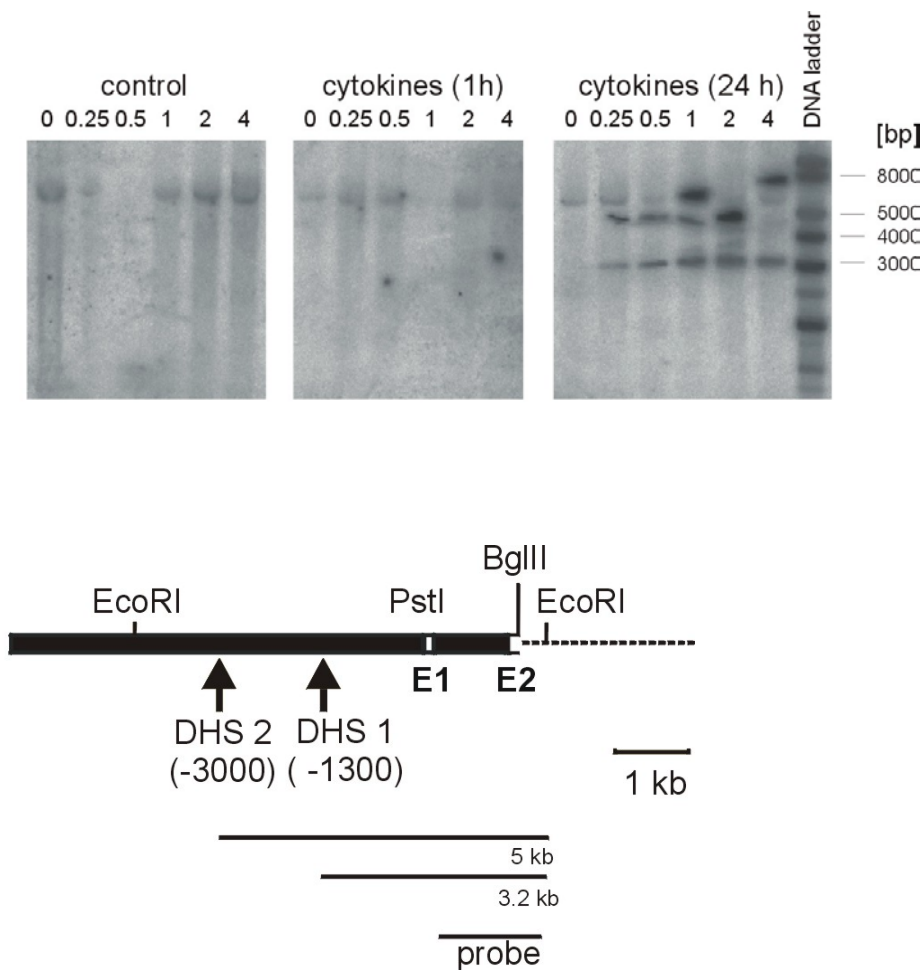


Abb. 18: DNAse I Hypersensitive Sites

DNAse I behandelte Zellkerne von unstimulierten und 60 min mit Zytokinmix stimulierten Zellen zeigen ein Fragment der erwarteten Größe. Die für 24 Stunden mit Zytokinen stimulierten Zellkerne zeigen zusätzliche Banden in einer Größe von 5 und 3,2 kb.

Aus diesen Daten ließen sich zwei DNAse I hypersensitive Bereiche in der Region von 1300 und 3000 bp upstream des Transkriptionsstarts ableiten, die nachfolgend DHS1 bzw. DHS2 genannt werden.

Nach Sequenzvergleichen der hypersensitiven Stellen in der TransFac Datei zeigten sich Homologien zu potentiellen PPAR Bindungsstellen. Zur Untersuchung dieser PPAR Bindestellen wurde zunächst der die Wirkung von verschiedenen PPAR-Agonisten auf die IL-1 β -induzierte iNOS Expression untersucht.

4.12.2. Effekte von PPAR- α Agonisten und dem Inhibitor MK 886 auf die Zytokin-induzierte Nitrit Bildung

Zur Untersuchung der Wirkung von PPAR- α Aktivatoren auf die Aktivität der induzierbaren NO-Synthase wurden Mesangiumzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von PPAR- α Agonisten Wy 14643, Ly 171883 und DHA (Docosahexaensäure) in Kombination mit einer suboptimalen Konzentration Interleukin 1 β [1nM] für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Nitritkonzentration im Mediumüberstand gemessen.

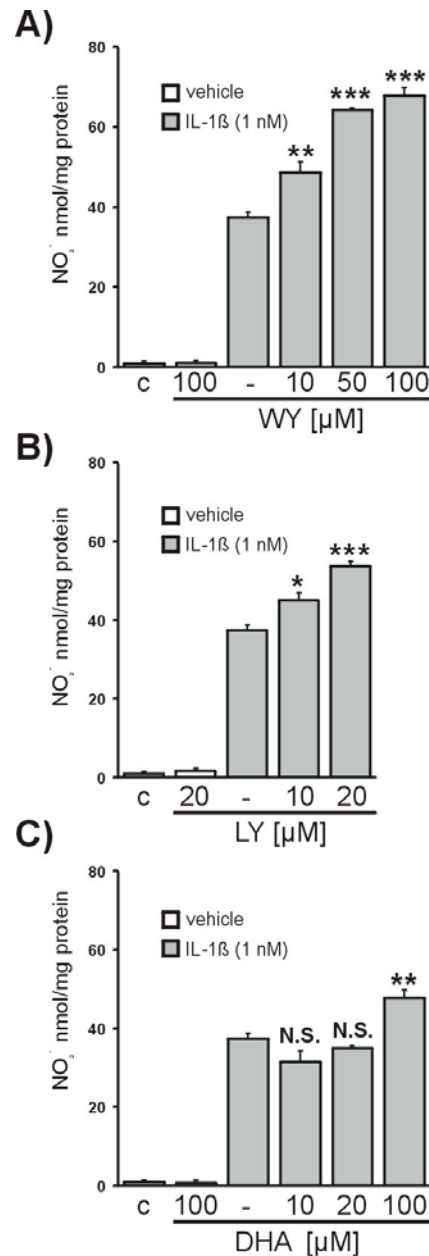


Abb. 19: Wirkung der PPARα Aktivatoren Wy 14643, Ly 171883 und DHA auf die Nitrit Produktion in Ratten-Mesangiumzellen

Konfluente Mesangiumzellen wurden 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen

A) Wy 14643,

B) Ly 171883,

C) DHA(Docosahexaensäure)

und IL-1β stimuliert. Anschließend wurde aus den Überständen Nitrit mittels Griess-Reaktion detektiert und im Photometer gemessen.

Die Messung von Nitrit, des stabilen Endproduktes der induzierbaren NO-Synthase zeigt, dass Wy, Ly und DHA alleine keinen Effekt auf die Nitritbildung haben. Wy und Ly in Kombination mit IL 1 β zeigen eine signifikante konzentrationsabhängige Steigerung (1,81 fach) der Nitritgeneration gegenüber der Stimulation des Zytokins alleine (für IL-1 β $37,38 \pm 1,39$; für IL-1 β + Wy $14643 \ 67,76 \pm 2,03$ nMol/mg Protein). Die Steigerung fällt bei DHA hingegen geringer aus. Die maximale Steigerung wird bei 100 μ M Wy bzw. 20 μ M Ly erreicht. Bei höheren Konzentrationen wirken die Substanzen toxisch.

Zur Analyse der Wirkung eines PPAR- α Inhibitors auf die Nitrit Produktion wurden die IL-1 β stimulierten Zellen 24 Stunden mit dem Inhibitor MK 886 inkubiert. MK 886 wurde ursprünglich als ein Inhibitor der FLAP (5-lipoxygenase activating protein) identifiziert. 2001 wurde MK 886 von Kehrer et. al. als ein PPAR- α Inhibitor beschrieben [112].

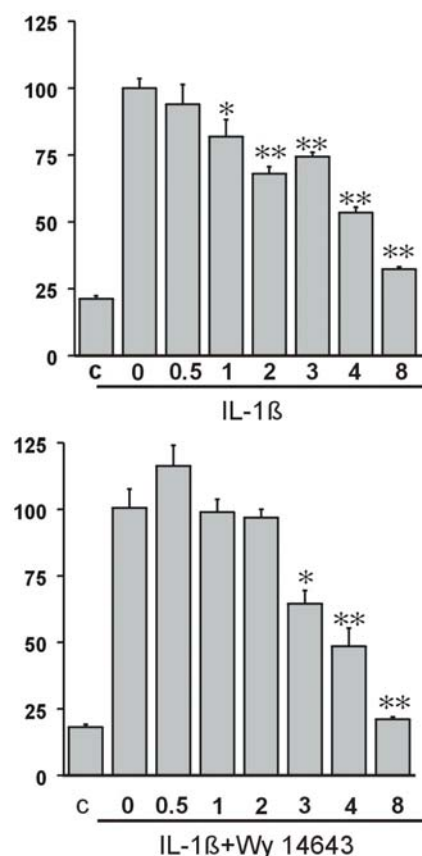


Abb. 20: Wirkung des Inhibitors MK 886 auf die Zytokin induzierte Nitrit Produktion in Ratten Mesangiumzellen

Konfluente Mesangiumzellen wurden 24 Stunden mit 1 nM IL-1 β (Abb. oben) oder 1 nM IL-1 β + Wy 14643 [50 μ M] (Abb. unten) mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors MK 886 [0,5; 1; 2; 3; 4; 8 μ M] für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde aus den Überständen Nitrit mittels Griess-Reaktion detektiert und im Photometer gemessen.

Der Inhibitor MK 886 vermindert die Nitrit Produktion von IL-1 β stimulierten Mesangiumzellen konzentrationsabhängig sowohl in bei Zugabe von Wy 14643 als auch ohne den PPAR- α Agonisten.

4.12.3. Wirkung von Wy 14643 auf die IL-1 β -induzierte iNOS Protein Expression.

Zur Untersuchung ob die Wirkung der gesteigerten Nitrit-Produktion nach Stimulation der Zellen mit Wy 14643 auf eine vermehrte iNOS Proteinbildung zurückzuführen ist, wurden Mesangiumzellen mit IL-1 β und steigenden Konzentrationen Wy 14643 stimuliert und die Proteinexpression mittels Western-Blot analysiert.

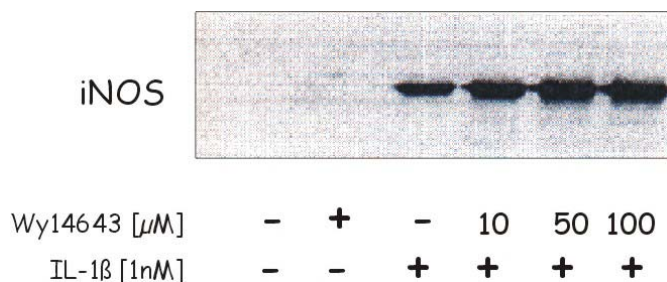


Abb. 21: Wirkung von Wy 14643 auf das iNOS Protein in Ratten Mesangiumzellen

Die Zellen wurden 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen Wy 14643 stimuliert und das Protein isoliert. 100 μ g Gesamt-Protein wurden auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen, auf eine Nylonmembran geblottet und der Immunreaktion zugeführt. Das Protein wurde mit einem anti-iNOS N-terminalen Antikörper detektiert (Kunz D., Walker G., Pfeilschifter J.: Biochem J 304:337-340, 1994). Die Banden repräsentieren das mit ECL System detektierte iNOS Protein (130 kDa)

Mesangiumzellen, die mit einer Konzentration von 10 μ M Wy 14643 stimulierten wurden, zeigen eine signifikante Steigerung der iNOS Protein Expression.

4.12.4. Wirkung von Wy 14643 auf die Zytokine-induzierte iNOS mRNA Expression.

Zur Untersuchung ob der Einfluss von Wy 14643 auf die Zytokin induzierte Protein Expression der induzierbaren NO-Synthase mit einer gesteigerten mRNA einhergeht, wurden die Mesangiumzellen erneut mit verschiedenen Konzentrationen Wy 14643 und Interleukin 1 β stimuliert und der Effekt mittels Northern-Blot analysiert.

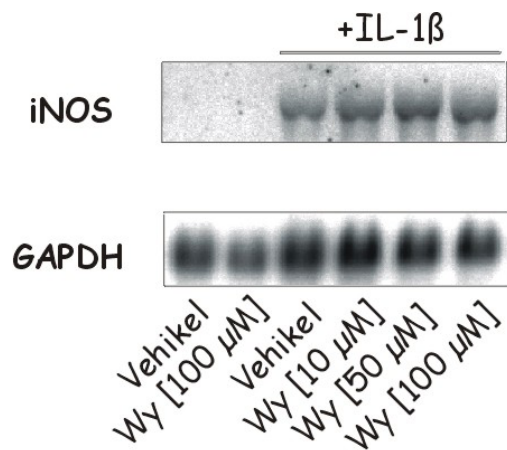


Abb. 22: Wirkung der PPAR- α Aktivatoren Wy 14643 auf die iNOS mRNA Expression

Ratten-Mesangiumzellen wurden in Stimulationsmedium für 24 Stunden mit 1nM IL-1 β bzw. 1nM IL-1 β + Wy 14643 [10; 50; 100 μ M] stimuliert und anschließend wurde RNA isoliert. 15 μ g Gesamt-RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten iNOS cDNA Sonde. Anschließend wurde der Northern-Blot gestrippt und mit einer ebenfalls radioaktiv markierten GAPDH-Sonde rehybridisiert.

Die Zytokin induzierte iNOS mRNA Expression wird vergleichbar der Protein Expression konzentrationsabhängig nach Zugabe von Wy 14643 gesteigert.

4.12.5. Regulation der iNOS-Promotor Aktivität durch Wy 14643

Um die Wirkung von Wy 14643 auf die iNOS Promotor-Aktivität zu untersuchen, und der Frage nachzugehen, ob DHS1 bzw DHS 2 oder vielleicht beide für diesen Effekt verantwortlich sind, wurden unterschiedlich lange Promotorfragmente kloniert.

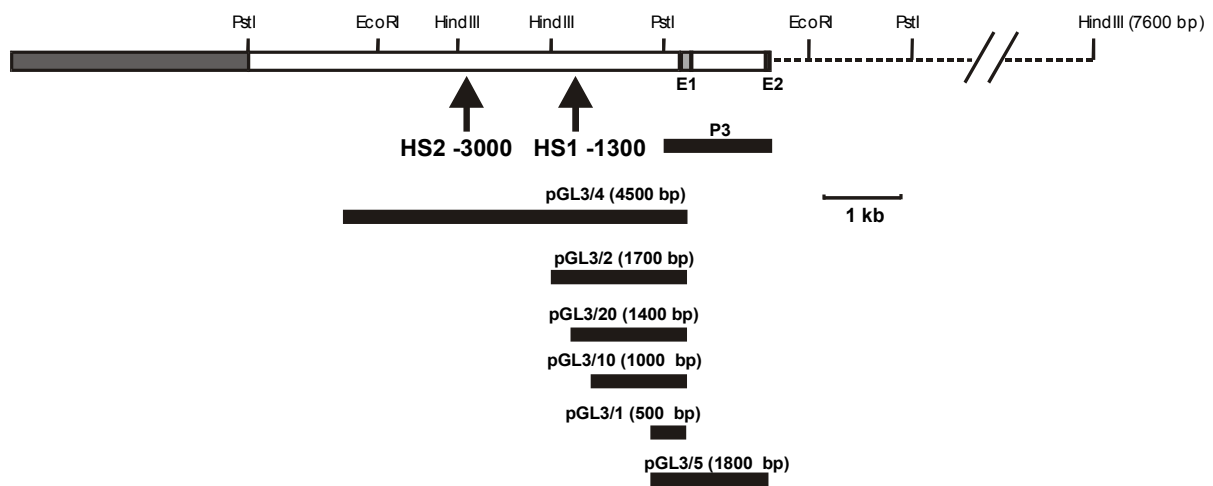


Abb. 23: iNOS Promotordeletionen im Überblick

Die Promotorfragmente pGL3/4 (4439 bp) und pGL3/2 (1713 bp) waren in der Arbeitsgruppe Prof. Pfeilschifter vorhanden. Mittels PCR wurde ein Plasmid pGL3/20 konstruiert, welches 1287 bp lang ist. pGL3/20 enthält kein potentielles PPAR-Element, pGL3/2 enthält das PPAR-Element der DHS 1, während das längste Promotorstück pGL3/4 alle drei potentiellen PPAR Bindestellen der DHS 1 und DHS 2 enthält.

Zunächst wurde das 4,5 kb lange pGL3/4-iNOS- Fragment in Mesangiumzellen transfiziert und mit Interleukin 1 β und Wy 14643 für 24 Stunden stimuliert.

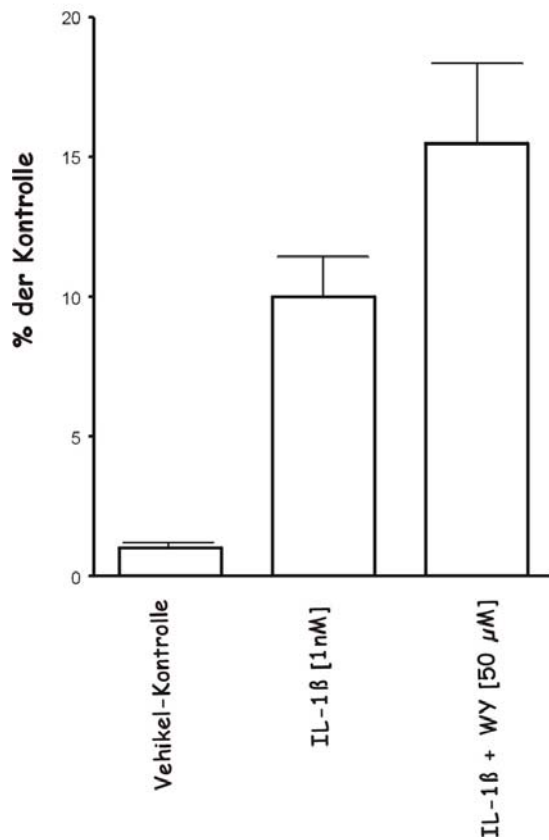


Abb. 24: Transfektion des 4,5 kB langen pGL3/4 iNOS Promotorfragments in Mesangiumzellen
60 %ig konfluente Mesangiumzellen wurden mit dem pGL3/4 Promotorfragment transfiziert und mit IL-1 β und Wy 14643 für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die Luziferase Aktivität mittels Photometer gemessen.

Wie in Abb. 24 zu sehen, ist eine signifikante (53%) Steigerung der IL-1 β induzierten Luziferase Aktivität durch Wy 14643 feststellbar.

Anschließend wurden die Promotordeletionen pGL3/2, pGL3/20 und pGL3/4 in Mesangiumzellen transfiziert um den möglichen Einfluss der PPAR-Elemente zu untersuchen. Dafür wurden die Zellen wieder mit IL-1 β und Wy 14643 stimuliert und die Luziferase Aktivität im Photometer gemessen.

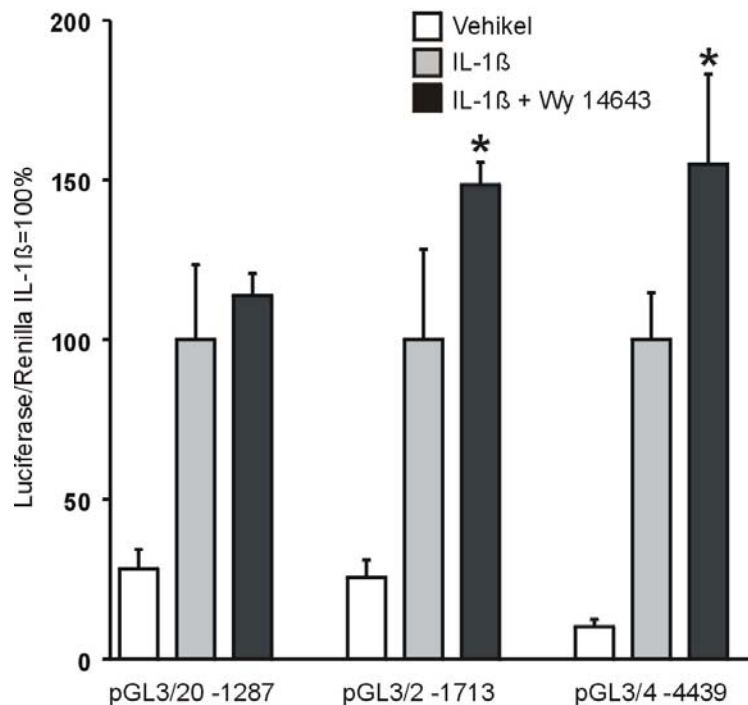


Abb. 25: Transfektion der verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen in Ratten-Mesangiumzellen

Zu 60 % konfluente Mesangiumzellen wurden mit den verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen pGL3/2, pGL3/20 und pGL3/4 transfiziert und mit IL-1 β (1nM) und Wy 14643 (50 μ M) für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die Luziferase Aktivität mittels Photometer gemessen. *P<0,05 vgl. Kontrolle

Die Stimulation mit Wy 14643 zeigt bei pGL3/20 keinen Effekt. Die Konstrukte pGL3/2 und pGL3/4, die eine oder beide DNase hypersensitive Sites enthält zeigen eine erhöhte Luziferase Aktivität nach der Stimulation mit IL-1 β und Wy 14643.

4.12.6. Punktmutation des PPAR-Elementes

Durch Austausch zweier Basen des PPAR Elements der DHS 1 wurde eine Punktmutation des PPAR Elements geschaffen.

Für die Punktmutation (PPAR: AGGTCA; Mutation: AGCACA) im PPAR-Konsensus Element wurde der QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit von Qiagen verwendet. Die auf PCR basierende Mutagenese wurde mit den spezifischen Primern Mut1f und Mut1r nach Vorschrift durchgeführt. Das amplifizierte und sequenzierte PCR Fragment konnte anschließend KpN/PstI in den vorbereiteten pGL3-basic Vektor kloniert werden.

Erneute Transfektionsstudien schlossen sich an, deren Ergebnisse in Abb. 26 gezeigt sind.

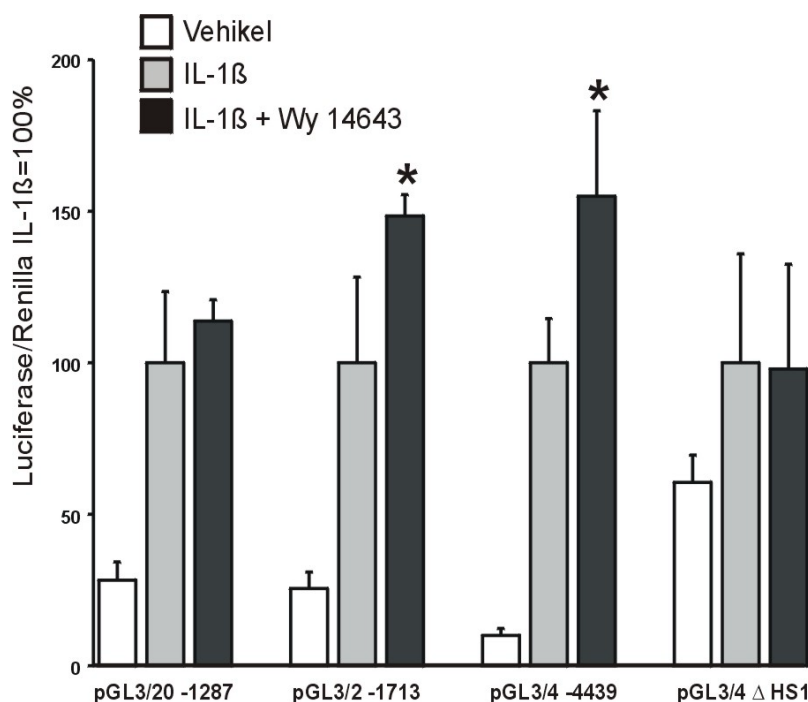


Abb. 26: Transfektion der verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen und der PPRE-Mutante
 Zu 60 % konfluente Mesangiumzellen wurden mit den verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen pGL3/2, pGL3/20, pGL3/4 und der Punktmutante transfiziert und mit IL-1 β (1nM) und Wy 14643 (50 μ M) für 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die Luziferase Aktivität mittels Photometer gemessen.

Nach der Punktmutation zeigt sich der Verlust der stimulierenden Wirkung von Wy 14643 auf die IL-1 β induzierte Luziferase Aktivität.

4.12.7. Untersuchung der Wy 14643-induzierten Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1

Die Untersuchung der Bindung von PPAR an die regulatorischen Elemente im iNOS Promotor wurden anhand von „Electrophoretic mobility shift Assays“ (EMSA) durchgeführt. Die Mesangiumzellen wurden 6 Stunden mit IL-1 β [1 nM], IL-1 β + Wy 14643 [50 μ M] stimuliert, nukleare Extrakte isoliert und mit einer radioaktiv-markierten DNA Probe (132 bp der DHS1 mit der putativen Bindestelle für PPAR) sowie mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid, welches die PPAR Konsensus Sequenz repräsentiert, inkubiert und auf einem 10 %igem Agarose-Gel aufgetrennt.

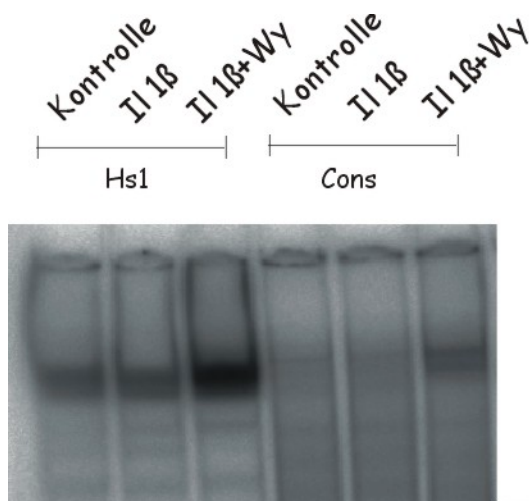


Abb. 27: Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1

Konfluente Mesangiumzellen wurden mit IL-1 β (1nM) und Wy 14643 (50 μ M) stimuliert und Kernextrakte isoliert. Diese wurden mit der radioaktiv markierten DHS 1 Sonde bzw. doppelsträngigen Oligonukleotid, das der PPAR Sequenz entspricht, inkubiert und anschließend auf einem 10 % igem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Es zeigt sich eine verstärkte Bindung des PPA-Rezeptors an der „hypersensitiven Stelle 1“ nach Stimulation mit IL-1 β + Wy 14643.

Für die Konkurrenz wurde in 20-100 facher Menge nicht-markiertes PPAR Konsensus Oligonukleotid zugegeben.

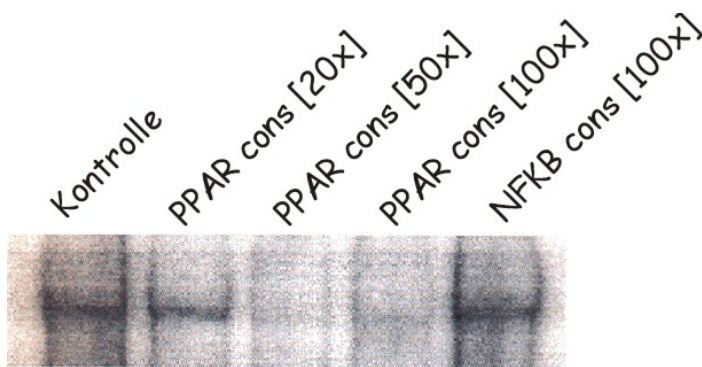


Abb. 28: Konkurrenz der Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1

Konfluente Mesangiumzellen wurden mit IL-1 β (1nM) und Wy 14643 (50 μ M) stimuliert und Kernextrakte isoliert. Diese wurden mit radioaktiv markiertem doppelsträngigem Oligonukleotid und nicht markiertem PPAR Oligonukleotid bzw NF κ B Oligonukleotid inkubiert. Anschließend wurden die Extrakte auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Durch Zugabe des nicht-markierten PPAR Oligos zeigt sich eine Schwächung der markierten PPAR Oligo Bindung.

Zur Kontrolle der Spezifität wurde 100faches unmarkiertes NF κ B Konsensus-Oligo eingesetzt. Dieses Oligo vermag die PPAR Bindung nicht abzuschwächen.

5. Diskussion

5.1. Eignung von Ratten-Mesangiumzellen als Zellsystem

Wegen der einfacheren Handhabung und der unlimitierten Verfügbarkeit im Vergleich zu primären Hepatozyten wurde die Verwendung von Ratten-Mesangiumzellen als Zellsystem für die geplanten Versuche angestrebt. Um zu klären, ob sich Mesangiumzellen eignen, wurden diese zunächst mit Dibuturyl-cAMP bzw. IL-1 β alleine und in Kombination mit der langkettigen Fettsäure Palmitinsäure stimuliert. Assimacopolous et al. [80] konnten in primären Ratten-Hepatozyten eine dosisabhängige Steigerung der CPT1 mRNA Expression zeigen, die in den Ratten-Mesangiumzellen bestätigt werden konnte. Auch die Wirkung von Insulin auf die Expression der CPT 1 mRNA entsprach bei den Mesangiumzellen den publizierten Hepatozyten Daten [13]. Somit boten sich für die weiteren Versuche Mesangiumzellen als Zellsystem an. Aufgrund der im Vergleich zu den Hepatozyten allerdings geringeren Expression der CPT 1 wurden die Untersuchungen mittels semiquantitativer PCR durchgeführt.

5.2. Effekte unterschiedlicher Fettsäuren auf die Zytokin-induzierte CPT 1 Expression

Chatelain et al. [78] zeigten, dass langkettige Fettsäuren wie Palmitinsäure und Ölsäure die CPT 1 mRNA Expression in Hepatozyten induzieren. Um die Wirkung von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlänge und Sättigungsgrad auf die Expression der CPT 1 in entzündlichen Stoffwechselprozessen festzustellen, wurden Mesangiumzellen mit Interleukin 1 β stimuliert. Mesangiumzellen exprimieren CPT 1 α , die Palmitoyltransferase der Leberisofom. Dies konnte mittels PCR und Western-blot Analyse gezeigt werden.

Docosahexaensäure, α -Linolensäure und γ -Linolensäure zeigten einen geringen stimulierenden Effekt. Interleukin 1 β induzierte beginnend nach 8 Stunden mit einem Stimulationsmaximum bei 24 Stunden die Expression der CPT 1 mRNA. Die

optimale Stimulationskonzentration lag bei 2 nM IL-1 β . Der zeitliche Verlauf der Induktion der CPT1 mRNA Expression entspricht dem Verlauf der Induktion der induzierbaren NO-Synthase.

In Kombination mit Interleukin 1 β konnte eine signifikante Steigerung der CPT 1 mRNA Expression für die Stimulation mit α -Linolensäure und γ -Linolensäure gezeigt werden, bei Stimulation mit Docosahexaensäure fiel die Induktion der Expression geringer aus. Auch Chatelaine et al. [78] konnten eine stimulierende Wirkung von Linolsäure in Ratten-Hepatozyten zeigen. Palmitat alleine vermag die Expression der CPT 1 nicht zu erhöhen. Die mittelkettige Fettsäure Caprylsäure hatte keinen modifizierenden Einfluss auf die Expression der CPT 1.

Schon Clarke et al. [101] berichteten 1981 über die Transport von Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen durch CPT 1.

Die erhöhte Expression der CPT 1 mRNA nach Stimulation mit langkettigen Fettsäuren kann aber nicht auf den Grad der Doppelbindungen zurückgeführt werden, da die γ -Linolensäure einen stärker induzierenden Effekt aufwies als die ebenfalls sechs Doppelbindungen enthaltende Docosahexaensäure. Auch lässt sich kein Zusammenhang des stimulierenden Effekts in Bezug auf die Lage der Doppelbindungen und damit die Einteilung in ω -3 und ω -6 Fettsäuren herleiten. Die aktivierten langkettigen Fettsäuren werden an Carnitin gebunden durch die Mitochondriummembran transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 80 μ M Carnitin einen co-stimulierenden Einfluss auf die

Expression der CPT 1 hat. Die CPT 1 hat eine hohe Affinität zu Malonyl-CoA und ist durch dieses hemmbar [1,2]. Malonyl-CoA wird durch die Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Fettsäure Synthese ist. Die Acetyl-CoA-Carboxylase wird durch Citrat aktiviert und durch langkettige Acyl-CoA Ester gehemmt. Diese Hemmung kann als Schutzmechanismus vor der Überflutung mit Acyl-CoA, die toxisch wirken, dienen.

Die Gabe von Carnitin könnte zur Verbesserung des Fettsäuretransports beitragen.

5.3. Klonierung des L-CPT 1 Promotors

Zur Klärung der Fragen, wie langkettige Fettsäuren und auch Carnitin ihren stimulierenden Einfluss auf die IL-1 β -induzierte CPT 1 Expression ausüben und ob dieser Effekt ein durch den Promotor vermittelter Effekt ist, war eine Klonierung des CPT1 Promotors wichtig. Der Ratten-Promotor ist 1999 von Steffen et al. [64] mit einer Länge von 8125 bp kloniert und publiziert worden. Meine diesbezüglichen Klonierungsversuche sind anfangs durch die von Park et al. [46] fehlerhaft publizierte Sequenzen erschwert worden. Mittels PCR konnte zuletzt von mir jedoch ein Fragment von 4235 bp des Ratten-Promotors amplifiziert werden, das nun in Zukunft in entsprechende Vektoren umklont werden kann.

Der CPT 1 Promotor, der durch das Schilddrüsenhormon stimulierbar ist, enthält keine TATA-Box [64].

Für den CPT 1 Promotor des muskulären Typs ist bekannt, dass er ein „Fatty acid response element-1“ (FARE-1) enthält, welches zwischen 775-763 upstream des initialen Codons lokalisiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass FARE-1 ein PPAR- α response element ist. Mittels „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) wurde demonstriert, dass PPAR- α mit dem Retinoid X Rezeptor (RXR- α) an FARE-1 bindet [70]. Nach Durchsuchen des L-CPT 1 Promotors fand ich ein PPAR- α Konsensus Element, welches ein Kandidat für die Fettsäure-vermittelte Regulation der CPT 1 Genexpression sein könnte.

5.4. Regulation der CPT 1 mRNA Expression im Endotoxinschockmodell in der Ratte

In Stoffwechselsituationen mit erhöhtem Energiebedarf oder mangelnder Energiezufuhr wie Diabetes, Hunger und Infektionen reagiert der Organismus mit einer Steigerung der Transkriptionsrate der Carnitin-Palmitoyltransferase, um so eine ausreichende Energieversorgung zu gewährleisten. Der Endotoxinschock hingegen ist gekennzeichnet durch eine Inhibition der Ketogenese. Zur Untersuchung dieses Phänomens auf RNA Ebene wurden Ratten mit LPS behandelt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten getötet. Die Analyse der CPT 1 mRNA aus

Lebergewebe bestätigte diese klinische Beobachtung. Bereits nach zwei Stunden konnte ein drastischer Abfall der CPT 1 mRNA beobachtet werden, der sich bis zu 24 Stunden fortsetzte.

Im Weiteren müssen diese Versuche auf Protein-Ebene noch bestätigt werden. Das LPS-Modell in Ratten-Mesangiumzellen erlaubt nun eine Untersuchung der Regulation der CPT 1 durch unterschiedliche Substanzen zur Verbesserung der Energiebilanz und damit auch der Überlebensrate im Endotoxinschock.

5.5. Wirkung von NO auf die Regulation der CPT 1

Endotoxin stimuliert u.a. die induzierbare NO-Synthase, die in der Folge die Umsetzung von L-Arginin in Citrullin unter Bildung von Stickstoffmonoxid katalysiert [16,17]. Darüber hinaus vermag auch das proentzündliche Zytokin IL-1 β die Expression der induzierbaren NO-Synthase zu stimulieren. Dadurch entstehen große Mengen an NO, das frei durch die Zellmembran diffundieren kann und an der Regulation von Genexpressionen beteiligt ist.

Der Zeitverlauf der CPT 1 Expression in Ratten-Mesangiumzellen nach Stimulation mit Interleukin 1 β lässt vermuten, dass NO, welches durch die IL-1 β stimulierbare NO-Synthase produziert wird, für diese CPT 1 Regulation verantwortlich ist [20,24]. NO hat eine stimulierende Wirkung auf die CPT 1 mit einem Maximum bei 500 μ M Deta-NO. In Kombination mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β konnte ich zunächst nach 30 min eine stimulierende Wirkung auf die CPT 1 Expression feststellen. Nach 2 Stunden zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der CPT 1 Expression. Diese Daten konnte ich auf mRNA und Proteinebene zeigen.

Interleukin 1 β ist in Mesangiumzellen in der Lage, die Bildung von NO und ROS (reaktive Sauerstoff Spezies) zu induzieren [107]. Radeke et al [108] zeigten, dass ROS bereits nach einigen Minuten, die signifikante Induktion der Expression der iNOS und damit die Bildung von NO einige Stunden dauert. Die anfängliche Steigerung der CPT 1 Expression nach Stimulation mit Deta-NO und IL-1 β könnte auf die frühe Bildung von ROS zurückgeführt werden. Für die spätere Hemmung der

CPT 1 Expression beginnend nach 2 Stunden könnte die massive Produktion von NO verantwortlich sein. NO könnte durch eine negative Rückkopplungsreaktion so seine eigene Biosynthese modulieren [109].

Die hier vorgestellten Resultate entsprechen dem klinischen Bild des Endotoxinschocks. Die Inhibition der Ketogenese ist ein wesentlicher Faktor für die hohe Mortalität der Patienten. Durch weitere Untersuchungen der Carnitin Palmitoyltransferase kann die Regulation mehr und mehr verstanden und somit zu einer Verbesserung der Überlebensrate im Endotoxinschock beigetragen werden.

5.6. NO und Hypoxie

Interleukin 1 β hat aber nicht nur einen Einfluss auf die induzierbare NO-Synthase, sondern aktiviert auch andere Enzymsysteme, z.B. Xanthin-Oxidase und NADPH-Oxidase. Es werden vermehrt reaktive Sauerstoffmetabolite (ROS) gebildet, die sehr effizient auf die Signaltransduktion wirken. NO bildet mit molekularem Sauerstoff oder O₂⁻, N₂O₃ oder Peroxynitrit (ONOO⁻), die in der Lage sind, Tyrosinreste zu nitrieren und Proteine zu nitrosieren [107]. Geschieht dies an Signalproteinen, wie Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren und G-Proteinen, hat dies Auswirkungen auf die Signaltransduktion und die Genexpression der Zelle. In diesem Zusammenhang untersuchte ich die CPT 1 mRNA Expression im hämorrhagischen Schock. Beim hämorrhagischen Schock handelt es sich um eine akute Entzündungsform mit hochgradigen Gefäßwandschäden, die zu Gefäßwandrissen mit konsekutiver Blutung führt. Dies führt zu einem lokalen O₂-Mangel (Hypoxie). Die von mir durchgeführten Versuche zur Regulation der CPT 1 mRNA Expression im hämorrhagischen Schock zeigten, dass die CPT 1 massiv niederreguliert wurde. Die gleichzeitige Gabe eines spezifischen iNOS-Inhibitors konnte diese Hemmung der CPT 1 mRNA Expression wieder aufheben. Dies lässt einen Einfluss der reaktiven Sauerstoffmetabolite annehmen. Durch Hypoxie regulierte Gene, wie Erythropoetin (EPO) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) werden durch den Transkriptionsfaktor Komplex HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 α) kontrolliert [87]. Auch der iNOS Promotor enthält HIF-1 Konsensus

Sequenzen. iNOS mRNA und Protein werden durch Hypoxie vermehrt gebildet [44,88,89].

Nach Stimulation mit Interleukin 1 β synthetisiert die Zelle zuerst O₂⁻. Nachfolgend wird NO aufgrund der Induktion der iNOS gebildet. Herrschen dann äquimolare Mengen O₂⁻ und NO vor, wird Peroxynitrit gebildet, was dann ebenfalls eigenständige regulatorische Wirkung ausüben kann. Die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Induktion der ROS metabolisierenden Enzyme nimmt rasch ab, während NO noch viele Stunden synthetisiert wird [106].

Aufgrund dieser ersten Hinweise für die Regulation der CPT 1 mRNA durch Hypoxie vermutete ich ein Hypoxie sensitives / responsives Element im CPT 1 Promotor. Beim Durchsuchen der Sequenz konnte ich ein putatives HIF-1 Konsensus Element (-500) im CPT 1 Promotor finden.

Wang et al. [83] konnten unter hypoxischen Bedingungen die Akkumulation von cytotoxischen langkettigen Acylcarnitinen (LCAC) im proximalen Tubulus zeigen. Hierfür wurde die Steigerung der CPT 1 Expression und ein nachgeschalteter Transportdefekt verantwortlich gemacht [37].

Die Wirkung von NO auf die Expression der CPT 1 könnte entweder direkt (NF κ B, AP-1, SP-1) oder über eine veränderte Balance der Wirkung von reaktiven Sauerstoffradikalen vermittelt sein.

Um diese Frage zu klären, müssten die Zellen z.B. mit Hypoxanthin / Xanthinoxidase stimuliert und die Wirkung auf die CPT 1 mRNA untersucht werden. Auch die Untersuchung des Einflusses von CoCl₂ als einfach zu handhabendes Mimetikum einer hypoxischen Stimulation könnte die CPT 1 Regulation verstehen helfen. Zum genaueren Verständnis der in die Regulation der CPT 1 involvierten Transkriptionsfaktoren ist die Klonierung des CPT 1 Promotors von großer Wichtigkeit.

5.7. Regulation der induzierbaren NO-Synthase durch PPAR- α

Den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Wirkung von PPAR- α (Peroxisome proliferator-activated receptor- α) auf die Regulation der induzierbaren NO-Synthase wurde die Frage nach dem Mechanismus für die

verzögerte und verlängerte iNOS Expression als Antwort auf die Zytokin Stimulation zu Grunde gelegt. Es konnten, nach Stimulation der Mesangiumzellen mit IL-1 β und TNF- α für eine Dauer von 24 Stunden, anhand von DNase 1-Hypersensitivitätsanalyse zwei DNase 1-hypersensitive Stellen identifiziert werden, die in der Region von 1300 (DHS1) und 3000 bp (DHS2) aufwärts des Transkriptionsstartes lokalisiert wurden. Kurzzeit-Stimulationen (1 Stunde) zeigten keine Veränderungen, so dass DHS1 und DHS2 möglicherweise für die späte Phase der transkriptionellen iNOS Expression verantwortlich gemacht werden könnte.

Kuo et al. [91,92] konnten in Ratten-Hepatozyten eine gesteigerte Induktion der iNOS Expression nach Stimulation mit Superoxid zeigen. Mittels Transfektionsstudien charakterisierten sie ein ARE (antioxidant responsive element), welches für diese Induktion durch Superoxid verantwortlich ist. Dieses ARE liegt in der Region von DHS1. Auch Zhang et al. [93] konnten die Notwendigkeit von 3200 bp zur vollständigen Induktion des iNOS Promotors durch Zytokine zeigen.

Computeranalysen zeigten, dass beide hypersensitiven Stellen putative PPAR- α Bindedestellen enthalten. Die IL-1 β induzierte iNOS Expression konnte auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebene durch den PPAR- α Agonisten Wy 14643 koinduziert werden.

Zur Untersuchung der Regulation der iNOS-Promotor Aktivität durch PPAR- α wurden unterschiedlich lange Promotorkonstrukte verwendet. Das Konstrukt pGL3/20, welches kein PPAR- α Konsensus Element enthält zeigte keinen kostimulierenden Effekt nach Behandlung mit Wy 14643. Transfektionen mit dem Konstrukt pGL3/2 dagegen zeigten eine erhöhte Luciferase-Aktivität. Einen vergleichbaren Effekt erhielten wir mit dem Konstrukt pGL3/4, welches beide hypersensitiven Stellen umspannt. Daraus folgerte ich, dass die Hypersensitive Stelle 2 keinen weiteren stimulierenden Effekt auf die iNOS Expression haben würde, da kein Unterschied zwischen den Stimulationssteigerungen der Konstrukten pGL3/2 und pGL3/4 ausgemacht

werden konnte. Aus diesem Grunde konzentrierte ich bei den nachfolgenden Versuche auf das PPAR- α Element der DHS 1.

Die Punktmutation dieses PPAR- α Element zeigte den Verlust der koinduzierenden Wirkung von Wy 14643 auf die Interleukin 1 β stimulierte iNOS Expression. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass PPAR- α für die Stimulation ein wichtiges Element ist.

Zur Bestätigung, dass DHS 2 keinen Einfluss auf die iNOS Expression hat, müssten in Zukunft aber auch die zwei PPAR- α Konsensus Elemente der hypersensitiven Stelle 2 mutiert werden.

Mit den nachfolgend durchgeführten Electrophoretic-mobility-shift Assays konnte ich die Wy 14643-induzierte Bindung des PPA-Rezeptors an die hypersensitiven Stelle 1 zeigen. Eine Supershiftanalyse mit einem PPAR- α Antikörper steht noch aus. Es konnte mit diesen Versuchen gezeigt werden, dass Lipid-Mediatoren, die nach Zytokinstimulation endogen gebildet werden in der Lage sind, co-induzierend auf die induzierbare NO-Synthase zu wirken. Inflammatorische Zytokine induzieren die Expression und Sekretion der Phospholipase A₂ (sPLA₂) in Ratten-Mesangiumzellen [110], wodurch Arachidonsäure und Lysophospholipide bereitgestellt werden, die dann zu verschiedenen Eicosanoide metabolisiert werden. Arachidonsäure selbst und die Metaboliten Leukotriene B₄ und Prostaglandin D₂ sind als potente Aktivatoren von PPAR- α bekannt. Die sekretorische Phospholipase A₂ führt zur Aktivierung der cytosolischen Phospholipase A₂ und zusammen mit der Induktion der Expression der Cyclooxygenase 2 (COX 2) führt dies zur Steigerung der Prostaglandin Produktion [111]. Diese Bildung von Lipid-Metaboliten durch eine gesteigerte Aktivität von sPLA₂ und COX 2 in pro-entzündlichen Prozessen könnte ein Mechanismus sein, der seine Ursache in einer anhaltenden iNOS Expression in Mesangiumzellen hat.

In jüngster Zeit wurde mehr und mehr die Rolle von PPAR in Entzündungsprozessen untersucht [40,94-97]. Reilly et al. [39] zeigten dass die LPS-induzierte iNOS Expression durch Prostaglandin J₂, einem PPAR- γ Agonisten,

gehemmt wurde. Sowohl PPAR- α als auch PPAR- γ Agonisten wurden als anti-entzündliche Mediatoren beschrieben [97,98,99]. Westenfeld et al. [100] postulierten in einem Modell der Anti-Thy-1-Glomerulonephritis, durch Hemmung der iNOS Aktivität mit L-NIL, einem spezifischen Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase, einen protektiven Effekt der iNOS in chronisch-entzündlichen Prozessen beobachtet zu haben. In diesem Zusammenhang könnte die Rolle der PPAR Agonisten als anti-entzündliche Mediatoren erklärt werden.

Die Feststellung, dass Lipid-Mediatoren koinduzierende Wirkung auf die iNOS haben, und die Frage, wie langkettige Fettsäuren die Regulation der CPT 1 regulieren, ließ mich ebenfalls ein PPAR- α Konsensus Element im CPT 1 Promotor vermuten. Auch die Funktion von PPAR als Regulator des Lipid und Lipoproteinstoffwechsels ließ mich ein Vorhandensein eines PPAR Elementes annehmen.

Funktionelle PPRE's (peroxisome proliferator response elements) konnten in der Promotor-Region von Enzymen indentifiziert werden, die in den Fettstoffwechsel involviert sind [33,81,69,70,49]. Gulick et al. [49] konnten zeigen, dass die regulatorische Wirkung von Fettsäuren über PPAR vermittelt wird.

Es ist bekannt, dass Fettsäuren die Transkription der M-CPT 1 in Myocyten stimulieren. Brandt et al. [69,70] konnten zeigen, dass das M-CPT 1 Gen ein „Fatty acid responsive element“ (FARE) enthält, das PPAR- α und den Retinoid X Rezeptor bindet. Auch die Regulation der humanen muskulären CPT 1 via PPAR ist beschrieben.

Um einen Hinweis auf einen Einfluss von PPAR- α auf die zytokin-induzierte L-CPT 1 Expression zu bekommen, wurden die Mesangiumzellen mit dem PPAR- α Agonisten Wy 14643 stimuliert und die CPT 1 mRNA Expression untersucht. Dieser erste Versuch zeigte, dass PPAR- α einen stimulierend auf die CPT 1 Expression hat. Louet et al. [52] publizierten 2001 im Gegensatz zu

meinen ersten Ergebnissen, dass in Hepatozyten langkettige Fettsäuren die CPT 1 Genexpression über einen PPAR- α unabhängigen Weg regulieren.

Zur Klärung der Frage, wie langkettige Fettsäuren die CPT 1 Genexpression zu stimulieren vermögen, müssen Transfektionsexperimente mit Promotordeletionen und Punktmutationen im PPAR- α Konsensus Element durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit gezeigte Regulation der CPT 1 beschränkte sich auf die mRNA und Protein Ebene. Um den Nachweis zu erbringen, dass dieses Protein auch ein aktives Protein ist wird es in zukünftigen Arbeit von großer Wichtigkeit sein, die gezeigte Regulation auch auf funktioneller Ebene in einem Aktivitätstest zu belegen.

6. Zusammenfassung

Fettsäuren haben vielfältige Funktionen im Organismus. Sie sind der wichtigste Energieträger des menschlichen Körpers. Fettsäuren sind Bestandteil menschlicher Membranen und Ausgangspunkt für die Biosynthese biologisch aktiver Substanzen. Der Abbau der Fettsäuren und deren energetische Verwertung geschieht im Mitochondrium, dem Ort der β -Oxidation. Hierfür werden die Fettsäuren mit Hilfe des aus 3 Enzymen bestehenden Carnitin- Palmitoyltransferase-Systems aus dem Cytosol in das Mitochondrium transportiert. Dazu werden langkettige Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetase aktiviert und – an Carnitin gebunden – in das Innere der Mitochondrien geschleust. Die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 (CPT 1) ist an der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran gebunden und katalysiert die Kopplung von L-Carnitin an die aktivierte Fettsäure unter Freisetzung von Coenzym A. Das so entstandene Acyl-Carnitin passiert mit Hilfe der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase (CAC) die innere Mitochondrienmembran. An der Innenseite der mitochondrialen Innenmembran überträgt die Carnitin-Palmitoyltransferase 2 (CPT 2) den Fettsäurerest des Acyl-Carnitins auf Coenzym A, wobei Acyl-CoA und freies Carnitin entsteht. Nun schließt sich der Abbau der Fettsäuren, die β -Oxidation an.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 in Entzündungszuständen und die Klärung der Frage, ob Stickstoffmonoxid (NO) einen Einfluss auf die Regulation der CPT 1 hat. Darüberhinaus wurde die Wirkung von PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α) auf die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und damit die Generierung von NO untersucht. Die Experimente wurden an Ratten-Mesangiumzellen durchgeführt.

Interleukin 1 β stimuliert die Expression der CPT 1 auf mRNA und Protein-Ebene. In Kombination mit Palmitat und Carnitin konnte die Expression der CPT 1 signifikant gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass NO ein potenter Stimulator der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 ist. Mesangiumzellen, die mit NO und IL-1 β kombiniert stimuliert wurden, zeigten bereits nach 2 Stunden eine Reduktion der

Expression auf das Niveau der unstimulierten Kontrolle. IL-1 β und L-N^G-Monomethyl-Arginin (L-NMMA), ein spezifischer Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase erhöhen die CPT-1 Expression. In einem Tiermodell des hämorrhagischen Schocks wurde die CPT 1 mRNA Expression signifikant reprimiert, die Gabe eines iNOS-Inhibitors konnte diese Herunterregulierung wieder aufheben.

Stickstoffmonoxid spielt eine sehr wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. Die induzierbare NO-Synthase ist das verantwortliche Enzym für die Produktion von großen Mengen NO. Die NO-Synthase (NOS) katalysiert die Umsetzung von L-Arginin unter Sauerstoffverbrauch in Citrullin unter Entstehung von NO.

Der Mechanismus, der für einen verzögerten Beginn der Transkription von vier Stunden mit darauf folgender mehr als 24-stündiger immenser mRNA Synthese nach einer Zytokinstimulation verantwortlich ist, ist noch nicht verstanden.

Der Untersuchung dieser verzögerten und anhaltenden iNOS Expression lag die Hypothese zugrunde, dass die Zytokin-induzierte iNOS Transkription zuerst durch NF κ B und C/EBP Transkriptionsfaktoren ausgelöst und anschließend durch andere Mediatoren verlängert und verstärkt wird. Zur Identifizierung möglicher regulatorischer Elemente wurden 4,5 kb der 5' flankierenden Region des iNOS Promotors aufwärts des Transkriptionsstarts kloniert. Mittels Analyse der DNase 1 hypersensitiven Bereiche der 5' Region des iNOS Gens konnten zwei hypersensitive Stellen identifiziert werden (DHS1: 1300bp; DHS2: 3000bp). Beide Stellen enthalten putative PPAR-Bindestellen. Zur weiteren Untersuchung wurde die Wirkung des PPAR- α auf die iNOS analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der PPAR- α Agonist Wy 14643 in Kombination mit IL-1 β in der Lage ist sowohl Aktivität, Protein als auch die mRNA der iNOS zu steigern. Transfektionsexperimente mit deletierten und mutierten iNOS Promotorfragmenten zeigten, dass DHS1 das für die Stimulation verantwortliche DNA Fragment enthält. Mittels Elektrophoretic-Mobility-Shift-Assay konnte gezeigt werden, dass der PPAR- α Agonist Wy 14643 die Bindung des PPAR-Rezeptors an DHS1 verstärkt.

7. Summary

Fatty acids have diverse functions in the organism. They are the most important source of energy of the human body. Fatty acids are components of human membranes and they initiate the biosynthesis of biologically active substances. The decomposition of fatty acids and their energetic utilization takes place in the mitochondrion, the place of β -oxidation. For this process the fatty acids are transported from the cytosol into the mitochondrion with the help of the carnitin Carnitine-palmitoyltransferase (CPT) system. During this process the long-chained fatty acids are activated by acyl-CoA-Synthetase and – linked to carnitine – transported into the inner mitochondrial membrane. Carnitine-palmitoyltransferase 1 (CPT 1) is linked to the outer mitochondrial membrane and catalyses the attachment of L-carnitine to the activated fatty acid while setting free the Coenzyme A. The new acylcarnitine molecule is transported into the mitochondria by the acylcarnitine translocase (CAC) in exchange for carnitine. Carnitine-palmitoyltransferase 2 (CPT 2) transfers the rest of the fatty acids of the acylcarnitine onto the CoA generating free carnitine. After that the β -oxidation follows.

The aim of this work was to investigate the Carnitine-palmitoyltransferase 1 on inflammatory situations and to answer the question, if nitric oxide (NO) influences the regulation of CPT 1. Furthermore, the effect of PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor- α) on the inducible NO-synthase (iNOS) was investigated and with this the formation of NO. The experiments were done with mesangial cells of rats.

Interleukin 1 β stimulates the expression of CPT 1 on the mRNA and protein level. Palmitate and carnitine together can significantly increase the expression of CPT 1. The results have shown that NO is a potent stimulator of Carnitin-palmitoyltransferase 1. Mesangial cells which had been stimulated with NO and IL-1 β showed a reduction of the expression of CPT 1 on (unstimulated) control level already after 2 hours.

IL-1 β and L-N^G-Monomethyl-Arginine (L-NMMA), a specific inhibitor of the inducible NO-synthase, increase the CPT 1 expression. For in vivo relevance I made experiments in an animal model of haemorrhagic shock, where the CPT 1 mRNA expression was significantly repressed. The addition of an iNOS-inhibitor could reverse this downregulation.

Nitric oxide plays a very important role in inflammatory reactions. The inducible NO-synthase is the enzyme responsible for the production of great amounts of NO. The NO-synthase (NOS) catalyses the change of L-arginine into citrulline using oxygen and generating NO.

We still do not understand the mechanism that is responsible for a four-hour delay of the beginning of the transcription followed by an immense twentyfour-hour lasting mRNA synthesis and after a cytokin stimulation.

The investigation of this delayed and permanent iNOS expression was based on the assumption that at first the cytokin induced iNOS transcription is triggered off by NF κ B and C/EBP transcriptional factors and then being extended and enhanced by other mediators.

To identify possible regulatory DNA elements, 4,5 kb of the 5'flanking region of the iNOS promoter has been cloned alongside the start of the transcription in an upwardly direction. By analysing of the the Dnase 1-hypersensitive areas of the 5' region of the iNOS gene two hypersensitive parts could be identified (DHS1: 1300 bp; DHS2: 3000 bp). Both regions contain putative binding sites for the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). For further investigation the effect of different PPAR- α agonists on iNOS expression were analysed. It was possible to prove that the PPAR- α agonist Wy 14643 in combination with IL-1 β is able to increase its activity, protein and, as well, the mRNA of iNOS. Transfectional experiments with deleted or mutated iNOS promotor fragments showed that DHS1 contains the DNA fragment responsible for the stimulation. Using electrophoretic mobility shift assay proved that the PPAR- α agonist Wy 14643 enhances the link of the PPA-Receptor onto DHS1.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das mitochondriale System

Abb. 2: Struktur des PPAR-RXR Komplexes

Abb. 3: Nachweis der CPT 1 mRNA im Genom von Ratten-Mesangiumzellen
mittels RT-PCR

Abb. 4: Nachweis des CPT 1 Proteins in Ratten-Mesangiumzellen
mittels Western-Blot

Abb. 5: CPT 1 Expression als Funktion der Interleukinkonzentration

Abb. 6: Expression der CPT 1 mRNA nach Stimulation von unterschiedlicher
Dauer mit IL-1 β .

Abb. 7: Stimulation der CPT 1 mit dem physiologischen Substrat Palmitat

Abb. 8: : Stimulation der CPT 1 mit Carnitin

Abb. 9: Regulation des CPT 1 Proteins in Ratten Mesangiumzellen

Abb. 10: Expression der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen nach Stimulation mit
unterschiedlichen Fettsäuren

Abb. 11: Effekt von LPS auf die Regulation der CPT 1 in Rattenlebern

Abb. 12: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen

Abb. 13: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 in Ratten-Mesangiumzellen in
Abhängigkeit der Zeit

Abb. 14: Effekt von NO auf die Regulation der CPT 1 Protein Expression in
Ratten-Mesangiumzellen

Abb. 15: Regulation der CPT 1 im hämorrhagischen Schock

Abb. 16: Klonierung des CPT 1 Promotors aus genomischer DNA

Abb. 17: Wirkung von Wy 14643 auf die Nitrit Produktion in Ratten-
Mesangiumzellen

Abb. 18: DNase I Hypersensitive Sites

Abb. 19: Wirkung der PPAR α Aktivatoren Wy 14643, Ly 171883 und DHA auf die Nitrit Produktion in Ratten-Mesangiumzellen

Abb. 20: Wirkung des Inhibitors MK 886 auf die Zytokin induzierte Nitrit Produktion in Ratten Mesangiumzellen

Abb. 21: Wirkung von Wy 14643 auf das iNOS Protein in Ratten Mesangiumzellen

Abb. 22: Wirkung der PPAR- α Aktivatoren Wy 14643 auf die iNOS mRNA Expression

Abb. 23: iNOS Promotordeletionen im Überblick

Abb. 24: Transfektion des 4,5 kB langen pGI3/4 iNOS Promotorfragments in Mesangiumzellen

Abb. 25: Transfektion der verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen

Abb. 26: Transfektion der verschiedenen iNOS Promotorverkürzungen und der Mutante

Abb. 27: Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1

Abb. 28: Konkurrenz der Bindung des PPA-Rezeptors an DHS 1

9. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest	Bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bgl II	Restriktionsenzym aus <i>Bacillus globigii</i>
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	die zur mRNA komplementäre DNA
cpm	radioaktive Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CPT	Carnitin-Palmitoyltransferase
cRNA	copy-RNA
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	Dulbeccos minimales essentielles Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase I	Desoxyribonuclease I
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
dpm	desintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E. coli	Escherichia coli

Eco RI	Restriktionsenzym aus <i>Escherichia coli</i> RY 13
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KPN I	Restriktionsenzym aus <i>Klebsiella pneumoniae</i>
L-NMMA	L-N ^G -Monomethyl-Arginin
M	molar
mA	Milliampere
MCS	Mutiple Klonierungsstelle
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
MM	Minimal-Methanol
mmol	Millimol
mol	Mol
MOPS	3-[Morpholino]propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PBS	Dulbeccos phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PO	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

RNase-Inhibitor	Ribonuklease-Inhibitor
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymeraskettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel
SSC	Kochsalz Natriumcitrat Lösung
TAE-Puffer	Tris-Acetate-EDTA-Puffer
TBS	Tris-buffered-saline
TBST	Tris-buffered-saline-Tween
TEMED	Tetranethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
W	Watt
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
2YT	Yeast-Extract-Trypton
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar

10. Literaturverzeichnis

- [1] **McGarry, J.D.; Brown, N.F., 1997:** The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system; From concept to molecular analysis
Eur. J. Biochem. 244: 1-14
- [2] **Bremer, J., 1981:** The effect of fasting on the activity of liver carnitine palmitoyltransferase and its inhibition by malonyl-CoA
Biochem. Biophys. Acta 665: 628-631
- [3] **Fritz, I., 1955:** The effects of muscle extracts on the oxidation of palmitic acid by liver slices and homogenates.
Acta Physiol. Scand. 34: 367-385
- [4] **Bremer, J., 1963:** Carnitine in intermediary metabolism. The biosynthesis of palmitylcarnitine by cell subfractions
J. Biol. Chem. 238:2774-2779
- [5] **Fritz, I.; Yue, K.T.N., 1963:** Long-chain carnitine acyl-transferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by carnitine
J. Lipid Res. 4: 279-288
- [6] **Esser, V.; Britton, C.H.; Weis, B.C.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1993:** Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding rat liver carnitine palmitoyltransferase 1: direct evidence that a single polypeptide is involved in inhibitor interaction and catalytic function
J. Biol. Chem. 268: 5817-5822

- [7] **Britton, C.H.; Schultz, R.A.; Zhang, B.; Esser, V.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1995:**
Human liver mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1: characterization of its cDNA and chromosomal localization and partial analysis of the gene
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1984-1988
- [8] **Brown, N.F.; Esser, V.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1994:**
Expression of a cDNA for rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 in yeast establishes that catalytic activity and malonyl-CoA sensitivity reside in a single polypeptide
J. Biol. Chem. 269: 26438-26442
- [9] **Esser, V.; Kuwajima, M.; Britton, C.H.; Krishnan, K.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1993:**
Inhibitors of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 limit the action of proteases on the enzyme: isolation and partial amino acid analysis of a truncated form of the rat liver isozyme
J. Biol. Chem. 268: 5810-5816
- [10] **Brown, N.F.; Esser, V.; Gonzalez, A.D.; Evans, C.T.; Slaughter, C.A.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1991:**
Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase 2 defines the amino terminus of the mature protein: possibility of differential modification of the rat and human isoforms
J. Biol. Chem. 266, 15446-15449
- [11] **Finocchiaro, G.; Taroni, F.; Rocchi, M.; Martin, A.L.; Colombo, I.; Tarelli, G.T.; DiDonato, S., 1991:**
cDNA cloning, sequence analysis, and chromosomal localization of the gene for human carnitine palmitoyltransferase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 661-665

- [12] **McGarry, J.; Sen, A.; Brown, N.F.; Esser, V.; Weis, B.C.; Foster, D.W.;, 1992:**
Biochemical, molecular biological and topographical features of the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system
Current concepts in carnitine research
- [13] **McGarry, J.; Woeltje, K.F.; Kuwajima, M.; Foster, D.W.;, 1989:**
Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase
Diabetes Metab. Rev. 5: 271-284
- [14] **Brown, N.F.; Weis, B.C.; Husti, J.E.; Foster, D.W.; McGarry, J., 1995:**
Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 isoform switching in the developing rat heart
J. of Biol. Chem. 270: 8952-8957
- [15] **Park, E.A.; Mynatt, R.L.; Cook, G.A.; Kashfi, K., 1995:**
Insulin regulates enzyme activity, malonyl-CoA sensitivity and mRNA abundance of hepatic carnitine palmitoyltransferase 1
Biochem. J. 310: 853-858
- [16] **Moncada, S.; Palmer, R.M.; Higgs, E.A., 1991:**
Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology
Pharmacol. Rev. 43:109-142
- [17] **Nathan, C.; Xie, Q., 1994:**
Regulation of biosynthesis of nitric oxide
J. Biol.Chem. 269: 13725-13728
- [18] **Kröncke, K.D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V., 1995:**
Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities
Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376: 327-343

- [19] **Nguyen, T.; Brunson, D.; Crespi, C.L.; Penman, B.W.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R., 1992:**

DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3030-3034

- [20] **Pfeilschifter, J. Schwarzenbach, H., 1990:**

Interleukin 1 und tumor necrosis factor stimulate cGMP formation in rat renal mesangial cells
FEBS. 273: 185-187

- [21] **Kröncke, K.D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V., 1997:**

Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where?
Nitric Oxide. 1: 107-120

- [22] **Eberhardt, W.; Kunz, D.; Pfeilschifter, J., 1994:**

Pyrolidine dithiocarbamate differentially affects interleukin 1 β and cAMP-induced nitric oxide synthase expression in rat mesangial cells
Biochem. Biophys. Res. Commun. 200: 163-170

- [23] **Pfeilschifter, J., 1991:**

Platelet-derived growth factor inhibits cytokine induction of nitric oxide synthase in rat mesangial cells
Eur. J. Pharmacol. 208: 339-340

- [24] **Kunz, D.; Mühl, H.; Walker, G.; Pfeilschifter, J., 1994:**

Two distinct signaling pathways trigger the expression of inducible nitric oxide synthase in rat mesangial cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5387-5391

[25] **Mühl, H.; Kunz, D.; Rob, P.; Pfeilschifter, J., 1993:**

Cyclosporin derivatives inhibit interleukin 1 β induction of nitric oxide synthase in renal mesangial cells

Eur. J. Pharmacol.. 24: 95-100

[26] **Kunz, D.; Walker, G.; Eberhardt, W.; Nitsch, D.; Pfeilschifter, J., 1995:**

Interleukin 1 β -induced expression of nitric oxide synthase in rat mesangial cells is suppressed by cyclosporin A

Biochem. Biophys. Res. Commun. 216: 438-446

[27] **Laskin, D.L.; Rodriguez del Valle, M.; Heck, D.E; Hwang, S.; Ohnishi, S.T.; Durham, S.T.; Goller, N.L.; Laskin, J.D., 1995:**

Hepatic nitric oxide Production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased inducible nitric oxide synthase gene expression

Hepatology. 166:557-580

[28] **Khedara, A.; Kawai, Y.; Kayashita, J.; Kata, N., 1996:**

Feeding rats the nitric oxide synthase inhibitor L-N-nitroarginine elevates serum triglyceride and cholesterol and lowers hepatic fatty acid oxidation

J. Nutrition 126: 2563-2567

[29] **Vamecq, J.; Latruffe, N, 1999:**

Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors

The Lancet Vol. 354

[30] **Janeway, C.A.; Travers, O., 1995:**

Immunologie.

Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

- [31] **Lehmann, J.M.; Lehnhard, J.M.; Oliver, B.B.; Ringold, G.M.; Kliewer, S.A., 1997:**

Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal antiinflammatory drugs

J. Biol. Chem. 79: 81-94

- [32] **Laemmli, U.K., 1970:**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.

Nature 227:680-685

- [33] **Latruffe, N.; Vamecq, J., 1997:**

Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as regulator of lipid metabolism

Biochemie. 79: 81-94

- [34] **Krey, G.; Braissant, O.; L'Horset, F. ; et. al., 1997:**

Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by co-activator-dependent receptor ligands assay

Mol. Endocrinol. 11: 779-791

- [35] **Grossman, S.L.; Lessem, J., 1997:**

Mechanism and clinical effects of thiazolidinediones

Exp. Opin. Invest. Drugs 6: 1025-1040

- [36] **Velasco, G.; Geelen, J.H.; Gomez del Pulgar, T. and Guzman, M., 1998:**

Malonyl-CoA-independent acute control of hepatic Carnitine Palmitoyltransferase 1 activity

J. Biol. Chem. 273: 21497-21504

- [37] **Paumen, M.B.; Ishida, Y.; Muramatsu, M.; Yamamoto, M and Honjo, T., 1997:**
Inhibition of Carnitine Palmitoyltransferase 1 augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis
J. Biol. Chem. 272: 3324-3329
- [38] **Neve, B.; Fruchart, J.C. and Staels, B., 2000:**
Role of Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in atherosclerosis
Biochem. Pharmacol. 60: 1245-1250
- [39] **Reilly, C.M.; Oates, J.C.; Sudian, J.; Crosby, M.B.; Halushka, P.V. and Gilkeson, G.S., 2001:**
Prostaglandin J₂ inhibition of mesangial cell iNOS expression
Clin. Immunol. 98(3): 337-345
- [40] **Corton, J.C.; Anderson, S.P. and Stauber, A., 2000:**
Centrale role of Peroxisome proliferator-activated receptors in the action of Peroxisome proliferators
Pharmacol. Review. 15: 961-964
- [41] **Jankov, R.P.; Luo, X.; Cabacungan, J.; Belcastro, R.; Frndova, H.; Lye, S.J. and Tanswell, K., 2000:**
Endothelin 1 and O₂-mediated pulmonary hypertension in neonatal rats: Role for products of Lipid peroxidation
Pediatric Research. 48: 289-298
- [42] **Wilmer, W.A.; Dixon, C.; Lu, L.; Hilbelink, T. and Rovin, B.H., 2001:**
A Cyclopentenone Prostaglandin activates mesangial MAP Kinase independently of PPAR-γ
Biochem. Biophys. Res. Comm. 281: 57-62

[43] **Isseman, I.; Green, S., 1990:**

Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators

Nature 347: 645-650

[44] **Beck, K.F.; Eberhardt, W.; Walpen, S.; Apel, M. and Pfeilschifter, J., 1998:**

Potential of nitric oxide synthase expression by superoxide in interleukin 1 β -stimulated rat mesangial cells

FEBS Lett. 435: 35-38

[45] **Barrero, M.J.; Marrero, P.F. and Haro, D., 2000:**

Regulation of the rat liver Carnitine Palmitoyltransferase 1 gene transcription by thyroid hormone

Biochem. Biophys. Res. Comm. 279: 81-88

[46] **Park, E.A.; Steffen, M.L.; Song, S.; Park, V.M. and Cook, G.A., 1998:**

Cloning and characterization of the promotor for the liver isoform of the rat carnitine palmitoyltransferase 1 (L-CPT1) gene

Biochem. J. 330: 217-224

[47] **Kerner, J.; Hoppel, C., 2000:**

Fatty acid import into mitochondria

Biochem. Biophys. Acta. 15:1-17

[48] **Jansen, M.S.; Cook, G.A.; Song, S. and Park, E.A., 2000:**

Thyroid hormone regulates carnitine palmitoyltransferase 1 α gene expression through elements in the promotor and first intron

J. Biol. Chem. 275: 34989-34997

[49] **Yu, G.; Lu, Y. and Gulick, T., 1998:**

Co-regulation of tissue-specific alternative human carnitine palmitoyltransferase 1 β gene promoters by fatty acid enzyme substrate
J. Biol. Chem. 273: 32901-32909

[50] **Andrieu-Abadie, N.; Jafrezou, J.P.; Hatem, S.; Laurent, G.; Levade, T. and Mercadier, J.J., 1999:**

L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation
FASEB. J. 13: 1501-1509

[51] **Shintani, M.; Nishimura, H.; Yonemitsu, S.; Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Inoue, G.; Yoshimasa, Y.; Nakao, K., 2000:**

Downregulation of leptin by free fatty acids in rat adipocytes: effect of triacsin C, palmitate, and 2-bromopalmitate
Metabolism 49: 326-330

[52] **Louet, J.F. ; Chatelain, F. ; Decaux, J.F. ; Park, E.A. ; Kohl, C.; Pineau, T., Girard, J. and Pegorier, J.P., 2001:**

Long-chain fatty acids regulate liver carnitine palmitoyltransferase 1 gene (L-CPT1) expression through a peroxisome-proliferator-activated receptor α (PPAR- α)-independent pathway
Biochem. J. 354: 189-197

[53] **Sanger, T.; Nicklen, S.; Coulson, A.R., 1977:**

DNA-sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467

[54] **Murthy, M.S.; Pande, S.V., 1994:**

A stress-regulated protein GRP58, a member of thioredoxin superfamily, is a carnitine palmitoyltransferase isoenzyme
Biochem. J. 304: 31-40

- [55] **Basu-Modak, S.; Braissant, O.; Escher, P.; Desvergne, B.; Honegger, P. and Wahli, W., 1999:**

The PTR family: a new group of peptide transporters. Peroxisome proliferator-activated receptor β regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures

J. Biol. Chem. 274: 35881-35888

- [56] **Hashimoto, T.; Cook, W.S.; Qi, C.; Yeldandi, A.V.; Reddy, J.K. and Rao, M.S., 2000:**

Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting

J. Biol. Chem. 275: 28918-28928

- [57] **Poynter, M.E. and Daynes, R.A., 1998:**

Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- κ B signalling, and reduces inflammatory cytokine production in aging

J. Biol. Chem. 273: 32833-32841

- [58] **Vogelstein, B.; Gillespie, D., 1979:**

Preparative and analytical purification of DNA from agarose.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:615-619

- [59] **Raspe, E.; Madsen, L.; Lefebvre, A.M.; Leitersdorf, I.; Gelman, L.; Peinado-Onsurbe, J.; Dallongeville, J.; Fruchart, J.C.; Berge, R. and Staels, B., 1999:**

Modulation of rat liver apolipoprotein gene expression and serum lipid by tetraacylthioacetic acid (TTA) via PPAR α activation

J. Lipid Res. 40: 2099-2110

- [60] **Rosen, E.D.; Walkey, C.J.; Puigserver, P. and Spiegelman, B.M., 2000:**

Transcriptional regulation of adipogenesis

Genes Development 14: 1293-1307

- [61] **Hattori, Y.; Hattori, S.; Kasai, K., 1999:**

Troglitazone upregulates nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells

Hypertension 33: 943-948

- [62] **Asano, T.; Wakisaka, M.; Yoshinari, M.; Iino, K.; Sonoki, K.; Iwase, M.; Fujishima, M., 2000:**

Peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 (PPAR γ 1) express in rat mesangial cells and PPAR γ agonists modulate its differentiation

Biochem. Biophys. Acta 1497: 148-154

- [63] **Barger, P.M.; Brandt, J.M.; Leone, T.C.; Weinheimer, C.J. and Kelly, D.P., 2000:**

Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth

J. Clin. Invest. 105: 1723-1730

- [64] **Steffen, M.L.; Harrison, W.R.; Elder, F.F.B.; Cook, G.A. and Park, E.A., 1999:**

Expression of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT 1 α) gene is regulated by Sp1 and nuclear factor Y: chromosomal localization and promotor characterization

Biochem. J. 340: 425-432

- [65] **Wang, D.; Harrison, W.; Buja, L.M.; Elder, F.F.B. and McMillin, J.B., 1998:**

Genomic DNA sequence, promotor expression, and chromosomal mapping of rat muscle carnitine palmitoyltransferase 1

Genomics 48: 314-323

- [66] **Berardi, S.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Carafoli, E. and Krähenbühl, S., 2000:**

Characterization of L-carnitine transport into rat skeletal muscle plasma membran vesicles

Eur. J. Biochem. 267: 1985-1994

- [67] **Abo-Hashema, K.A.H.; Cake, M.H.; Lukas, M.A. and Knudsen, J., 1999:**

Evaluation of the affinity and turnover number of both hepatic mitochondrial and microsomal carnitine acyltransferases: Relevance to intracellular partitioning of acyl-CoA's

Biochemistry 38: 15840-15847

- [68] **Sayed-Ahmed, M.M.; Shaarawy, S.; Shouman, S.A. and Osman, A.M.M., 1999:**

Reversal of doxorubicin-induced cardiac metabolic damage by L-carnitine

Pharmacol. Res. 39: 289-295

- [69] **Mascaro, C.; Acosta, E.; Ortiz, J.A.; Marrero, P.F.; Hegardt, F.G. and Haro, D., 1998:**

Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase 1 gene trascription by peroxisome proliferator-activated receptor

J. Biol. Chem. 273: 8560-8563

- [70] **Brandt, J.M.; Djouadi, F. and Kelly, D.P., 1998:**

Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase 1 gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α

J. Biol. Chem. 273: 23786-23792

- [71] **Kerner, J.; Hoppel, C., 1998:**

Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management

Annu. Rev. Nutr. 18: 179-206

- [72] **deVries, Y.; Arvidson, D.N.; Waterham, H.R.; Cregg, J.M.; Woldegiorgis, G., 1997:**

Functional characterization of mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1 and 2 expressed in yeast

Biochemistry 36: 5285-5292

- [73] **Zhu, H.; Shi, J.; deVries, Y.; Arvidson, D.N.; Cregg, J.M.; Woldegiorgis, G., 1997:**

Functional studies of yeast expressed human heart muscles carnitine palmitoyltransferase 1

Arch. Biochem. Biophys. 347: 53-61

- [74] **Prip-Buus, C.; Cohen, I.; Kohl, C.; Esser, V.; McGarry, J.D., Girard, J., 1998:**

Topological and functional analysis of the rat liver carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

FEBS Lett. 429: 173-178

- [75] **Brown, N.F.; Esser, V.; Gonzalez, A.D.; Evans, C.T.; Slaughter, C.A.; Foster, D.W.; McGarry, J.D., 1991:**

Mitochondrial import and processing of rat liver carnitine palmitoyltransferase 2 defines the amino terminus of the mature protein

J. Biol. Chem. 266: 15446-15449

- [76] **Asins, G.; Serra, D.; Arias, G.; Hegardt, F.G., 1995:**

Developmental changes in carnitine palmitoyltransferase 1 and 2 gene expression in intestine and liver of suckling rats

Biochem. J. 306: 379-384

- [77] **Thumelin, S.; Esser, V.; Cahvry, D.; Kolodziej, M.; Zammit, V.A.; McGarry, D.; Girard, J.; Pegorier, J.P., 1994:**
Expression of liver carnitine palmitoyltransferase 1 and 2 genes during development in rat
Biochem. J. 300: 583-587
- [78] **Chatelain, F.; Kohl, C.; Esser, V.; McGarry, J.D.; Girard, J.; Pegorier, J.P., 1996:**
Cyclic AMP and fatty acids increase carnitine palmitoyltransferase 1 gene transcription in cultured fetal rat hepatocytes
Eur. J. Biochem. 235: 789-798
- [79] **Pegorier, J.P.; Chatelain, F.; Thumelin, S.; Girard, J., 1998:**
Role of long-chain fatty acids in the postnatal induction of genes coding for liver mitochondrial β -oxidative enzymes
Biochem. Soc. Trans. 26: 853-858
- [80] **Assimakopoulou-Jeannot, F.; Thumelin, S.; Roche, E.; Esser, V.; McGarry, J.D.; Prentki, M., 1997:**
Fatty acids rapidly induce the carnitine palmitoyltransferase 1 gene in the pancreatic β -cell lines INS-1
J. Biol. Chem. 272: 1659-1664
- [81] **Schoonjans, K.; Staels, B.; Auwerx, J., 1996:**
Role of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression
J. Lipid Res. 37: 907-925
- [82] **Mynatt, R.; Park, M.L.; Thornegate, F.E.; Das, K.H.; Cook, G.A., 1994:**
Changes in carnitine palmitoyltransferase 1 mRNA abundance produced by hyperthyroidism and hypothyroidism parallel changes in activity
Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 932-937

[83] **Wang, D.; Xia, Y.; Buja, L.M.; MyMillin, J.B., 1998:**

The liver isoform of carnitine palmitoyltransferase 1 is activated in neonatal rat cardiac myocyte by hypoxia

Mol. Cell. Cardiol. 180: 163-170

[84] **Wenger, R.H., 2000:**

Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation

J. Exp. Biol. 203: 1253-1263

[85] **Genius, J.; Fandrey, J., 2000:**

Nitric oxide affects the production of reactive species in hepatoma cells: implications of process of oxygen sensing

Free Radical Biol & Med. 29: 515-521

[86] **Vargiu, C.; Belliardo, S.; Cravanzola, C.; Grillo, M.A. and Colombatto, S., 2000:**

Oxygen regulation of rat hepatocyte iNOS gene expression

J. Hepatology 32: 567-573

[87] **Wenger, R.H.; Gassmann, M., 1997:**

Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1

Biol. Chem. 378: 609-616

[88] **Mellilo, G.; Musso, T.; Sica, A.; Taylor, L.S.; Cox, G.W.;**

Varesio, L.A., 1995: A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promotor

J. Exp. Med. 182: 1683-1693

[89] **Vargiu, C.; Belliardo, S.; Cravanzola, C.; Grillo, M.A. and Colombatto, S., 2000:**

Oxygen regulation of the rat hepatocyte iNOS gene expression

J. Hepatology 32: 567-573

[90] **Huss, J.M.; Lavy, F.H. and Kelly, D., 2001:**

Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor- α / Retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes

J. Biol. Chem. 276: 27605-27612

[91] **Kuo, P.C.; Abe, K.Y.; Schroeder, R.A., 2000:**

Oxidative stress increases hepatocyte iNOS gene transcription and promotor activity

Biochem. Biophys. Res. Comm. 234(2): 289-292

[92] **Kuo, P.C.; Abe, K.Y.; Schroeder, R.A., 1997:**

Superoxide enhances interleukin 1 β -mediated transcription of the hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene

Gastroenterology 118(3): 608-618

[93] **Zhang, H.; Chen, X.; Teng, X.; Snead, C. and Catravas, J.D., 1998:**

Molecular cloning and analysis of the rat inducible nitric oxide synthase gene promotor in aortic smooth muscle cells

Biochem. Pharmacol. 55: 1873-1880

[94] **Fruchard, J.C.; Staels, B. and Duriez, P., 2001:**

PPAR's, metabolic diseases and atherosclerosis

Pharmacol. Res. 44: 345-352

[95] **Wada, K.; Nakajiima, A. and Blumberg, R.S., 2001:**

PPAR γ and inflammatory bowel diseases: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's diseases.

Trends.Mol. Med. 7: 329-331

[96] **Guan, Y.; Breyer, M.D., 2001:**

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease

Kidney Int. 60: 14-30

- [97] **Chinetti, G.; Fruchart, J.C. and Staels, B., 2000:**

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroad between lipid metabolism and inflammation
Inflamm. Res. 49: 497-505

- [98] **Jiang, C.; Ting, A.T. and Seed, B., 1998:**

PPARgamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines
Nature 391: 82-86

- [99] **Delerive, P.; De Bosscher, K.; Besnard, S.; Vanden Berghe, W.;
Peters, J.M.; Gonzalez, F.J.; Fruchart J.C.; Tedgui, A.; Haegeman, G.
and Staels, B., 1999:**

Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1
J. Biol. Chem. 274: 32048-32054

- [100] **Westenfeld, R.; Gawlik, A.; Marquardt, H.; de Heer, E.; Floege, J.;
Kreutz, R. and Ketteler, M., 2001:**

Selective iNOS inhibition aggravated anti-Thy-1-Glomerulonephritis – role of the endothelin system
Abstract in: Kidney and Blood Pressure Research 24: 332

- [101] **Clarke, R.H.; Bieber, L.L., 1981:**

Effect of micells on the kinetics of purified beef heart mitochondrial carnitine palmitoyltransferase
J. Biol. Chem. 256: 9861-9868

- [102] **Pfeilschifter, J.; Vosbeck, K., 1991:**

Transforming growth factor β_2 inhibits interleukin 1β - and tumor necrosis factor α -induction of nitric oxide synthase in rat mesangial cells
Biochem. Biophys. Res. Comm. 175: 372-379

- [103] **Beck, K.F.; Eberhardt, W., Frank, S.; Huwiler, A.; Meßmer, U.K.; Mühl, H. und Pfeilschifter, J., 1999:**

Inducible NO Synthase: Role in cellular signalling
J. of Exp. Biology – Review 202: 645-653

- [104] **Pautz, A.; Franzen, R.; Dorsch, S.; Böddinghaus, B.; Birner, V.A.; Pfeilschifter, J. und Huwiler, A., 2002:**

Cross-talk between nitric oxide and superoxide determines ceramide formation and apoptosis in glomerular cells
Kidney International 61: 790-796

- [105] **Thiemermann, C.; Szabo, C.; Mitchell, J.A., und Vane, J.R., 1993:**

Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 267-271

- [106] **Pfeilschifter, J.; Beck, K.F.; Eberhardt, W. und Huwiler, A., 2002:**

Changing gears in the course of glomerulonephritis by shifting superoxide to nitric oxide-dominated chemistry
Kidney International 61: 809-815

- [107] **Pfeilschifter, J.; Eberhardt, W; Beck, K:F., 2001:**

Regulation of gene expression by nitric oxide
Pflügers Arch - Eur. J. Physiol. 442: 479-486

- [108] **Radeke, H.H.; Meier, B.; Topley, N., 1990:**

Interleukin 1 α and tumor necrosis factor- α induce oxygen radical production in mesangial cells
Kidney Int. 37: 767-775

[109] **Mühl, H.; Pfeilschifter, J., 1995:**

Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 β -stimulated rat mesangial cells

J. Clin. Invest. 95: 1941-1946

[110] **Pfeilschifter, J.; Schalkwijk, C.; Briner, V.A., und van den Bosch, H., 1993:**

Cytokine-stimulated secretion of cytosolic of group II phospholipase A2 by rat mesangial cell. Its contribution to arachidonic acid release and prostaglandine synthesis by cultured rat glomerular cells

J. Clin. Invest. 92: 2516-2523

[111] **Pfeilschifter, J. und Huwiler, A., 1997:**

Phospholipase A2 in mesangial cells: control mechanism and functional importance

Exp. Nephrol. 5: 189-193

[112] **Kehrer, J.P.; Biswal, S.S.; Thullier, P.; Datta, K.; Fischer, S.M. und Vanden Heuvel, J.P., 2001:**

Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK 886

Biochem. J. 356: 899-906

11. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie I der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main in Kooperation mit dem Pharmazentrum Frankfurt.

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hansjosef Böhles für die Ermöglichung der Dissertation sowie für seine stetige und anregende Diskussionsbereitschaft. Mit seinem lebhaften Engagement hat er diese Arbeit stark motiviert und mit vorangetrieben.

Besonders darf ich Herrn Prof. Dr. J. Pfeilschifter für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Pharmazentrum Frankfurt und für seine wertvolle wissenschaftliche Begleitung danken.

Herzlich danke ich Herrn Dr. K.F. Beck für dessen umfassenden methodischen Anregungen und die Einbindung in sein Arbeitsgebiet, ohne die sich diese Arbeit nicht hätte entfalten können.

Meinen Kollegen im Labor des Pharmazentrums danke ich sehr für ihre fortwährende und wohlthuende Hilfsbereitschaft.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Regulation der Carnitin-Palmitoyltransferase 1 in systemischen
Entzündungszuständen unter besonderer Berücksichtigung des
Entzündungsmediators Stickstoffmonoxid**

in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie I der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

unter Leitung von **Herrn Prof. Dr. H.J. Böhles**
mit Unterstützung von Herrn Dr. T. Beeg

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 30.6.2002

Annette Gans

Lebenslauf

Annette Gans
Steinauer Straße 26
60386 Frankfurt

- Schulausbildung:* geboren am 10.6.1970 in Frankfurt/Main, verheiratet
Geburtsname: Annette Rösel
1977-1981: Grundschule
1981-1989: Schillerschule (Gymnasium) Frankfurt. Abitur 1989
- Ausbildung:* 1989-1992: Ausbildung zur Med.-Techn. Laboratoriums-Assistentin an der
J. W. Goethe Universität Frankfurt a. M.
- Studium:* April 1993 - September 1998: Studium der Oecotrophologie an der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Schwerpunktfach: Biochemie der Ernährung
Diplom: September 1998
- Oktober 1998 – Januar 2001: wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut
für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (Prof. H.J. Böhles) des Klinikums
der J. W. Goethe-Universität Frankfurt a.M. Die Forschungsarbeiten
wurden am Pharmazentrum Frankfurt a.M. in Kooperation mit der
Arbeitsgruppe von Prof. J. Pfeilschifter durchgeführt.
- seit Februar 2001: freie Mitarbeiterin der Software ascaion AG, Zürich
zum Aufbau des Projekts „edunite“ (Software zur Unterrichtsorganisation /
Schulkommunikation)